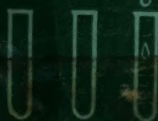


高等学校试用教材



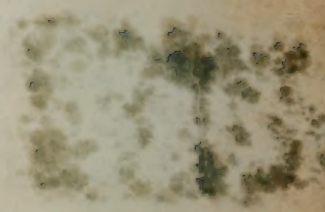
# 基础生物化学实验

北京师范大学生物系生物化学教研室 编



人民教育出版社

紙上金銀水











58.17  
163

高等学校试用教材

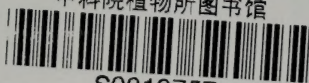
# 基础生物化学实验

北京师范大学生物系生物化学教研室 编



人民教育出版社

中科院植物所图书馆



S0013757

高等学校试用教材

# 基础生物化学实验

北京师范大学生物系生物化学教研室编

\*

人民教育出版社出版

新华书店北京发行所发行

人民教育出版社印刷厂印装

\*

开本 850×1168 1/32 印张 8.25 字数 190,000

1982 年 10 月第 1 版 1983 年 3 月第 1 次印刷

印数 00,001—14,800

书号 13012·0804 定价 0.75 元

## 前 言

本书根据 1980 年教育部制定的师范院校教学大纲编写而成，另外多增加了一些实验以供选用。可与《生物化学简明教程》配合使用。全书共分三篇。

第一篇选取了若干与所编写实验有关的技术理论和应用，使学生扩大这方面的知识。共分八章，包括实验的准确性、透析法、层析法、电泳法、分光光度法、同位素技术等。

在第二、三篇中共编写了四十组学生实验(每组用 3—4 学时，个别实验用 6—8 学时)和演示实验，其中多数是我们在历年教学中采用的；少数是从国内外参考书上选取，经过我们试作，认为适合基础生物化学实验用的。演示实验是根据目前一般师范院校实验教学学时和实验条件考虑的，各校应创造条件将其中若干实验改为学生实验。

由于我们的经验不足，理论水平有限，书中的错误和不足之处。敬希读者指正。

北京师范大学生物系生物化学教研室

1982 年 5 月





# 目 录

## 第一篇 常用生物化学实验技术及原理

第一章 实验的准确性 .....	1
一、单位和量 .....	1
(一) 基本单位 .....	1
(二) 导出单位 .....	2
(三) 词头 .....	3
(四) 与 SI 并用的单位 .....	3
(五) 摩尔和浓度 .....	4
二、准确测量 .....	5
(一) 误差来源 .....	5
(二) 正态分布曲线 .....	8
(三) 生物材料中数据的变化 .....	10
(四) 容量玻璃仪器 .....	11
三、实验报告 .....	11
(一) 结果的记录 .....	11
(二) 表格和图解 .....	13
第二章 透析 .....	17
一、膜 .....	17
二、溶剂 .....	18
三、物理条件 .....	18
四、Donnan 膜平衡 .....	18
第三章 层析法 .....	20
一、柱层析法的一般技术 .....	21



二、几种常用的层析法.....	24
(一) 吸附层析.....	24
(二) 离子交换层析.....	25
(三) 分配层析.....	30
(四) 薄层层析.....	35
(五) 凝胶层析.....	37
<b>第四章 电泳技术.....</b>	<b>43</b>
一、电泳技术基本原理.....	44
(一) 电场强度(电势梯度).....	45
(二) 溶液的 pH 值.....	46
(三) 溶液的离子强度.....	46
(四) 电渗现象.....	47
二、纸电泳.....	47
三、醋酸纤维薄膜电泳.....	48
四、琼脂凝胶电泳.....	49
五、聚丙烯酰胺凝胶电泳.....	50
<b>第五章 分光光度法.....</b>	<b>60</b>
一、原理.....	60
二、分光光度计的基本部件.....	63
(一) 光源.....	63
(二) 单色器.....	64
(三) 吸收池.....	65
(四) 检测器.....	65
(五) 测量装置.....	67
三、几种国产分光光度计的介绍.....	67
(一) 72型分光光度计.....	67
(二) 721 型分光光度计.....	68
(三) 751 G 型分光光度计.....	69
<b>第六章 放射性同位素技术.....</b>	<b>72</b>
一、基本知识.....	72
(一) 同位素.....	72
(二) 射线的性质.....	74
(三) 放射性衰变的规律.....	74



(四) 放射性强度的单位·····	76
二、射线的探测·····	76
(一) 盖革计数器·····	77
(二) 闪烁计数器·····	77
三、放射自显影术·····	78
四、放射性同位素法的优缺点·····	79
<b>第七章 Warburg氏呼吸计测压法</b> ·····	80
一、基本原理·····	80
二、仪器的构造·····	80
三、仪器使用的理论和操作要点·····	81
(一) 操作要点和计算方法·····	81
(二) 温压计·····	82
(三) 反应瓶体积的测定·····	83
<b>第八章 实验样品的制备</b> ·····	86
一、组织样品·····	86
二、血液样品·····	88
三、尿液样品·····	88

## 第二篇 学生实验

<b>第九章 蛋白质的化学</b> ·····	91
实验一 总氮量的测定——凯氏定氮法·····	91
实验二 氨基酸的分离鉴定——纸层析法·····	97
实验三 蛋白质的性质实验(一)——蛋白质及氨基酸的呈色反应·····	99
实验四 蛋白质的性质实验(二)——蛋白质的等电点测定 和沉淀反应·····	109
实验五 血清蛋白的醋酸纤维薄膜电泳·····	116
实验六 酪蛋白的制备·····	119
实验七 甲醛滴定法测定氨基氮·····	121
<b>第十章 核酸的化学</b> ·····	124
实验八 酵母核糖核酸的分离及组分鉴定·····	124
实验九 菜花(花椰菜)中核酸的分离和鉴定·····	126
实验十 醋酸纤维薄膜电泳分离核苷酸·····	130

实验十一	薄层层析法分离 AMP、ADP 和 ATP .....	132
<b>第十一章</b>	<b>酶 .....</b>	<b>136</b>
实验十二	酶的特性 .....	136
实验十三	枯草杆菌蛋白酶活力测定 .....	142
实验十四	底物浓度对酶促反应速度的影响——米氏 常数的测定 .....	145
实验十五	酶浓度对酶促反应速度的影响——用分光光度法 测定碱性磷酸酶活性 .....	148
实验十六	胰凝乳蛋白酶的制备及活力测定 .....	152
<b>第十二章</b>	<b>组织代谢 .....</b>	<b>159</b>
实验十七	肌糖原的酵解作用 .....	159
实验十八	小麦萌发前后淀粉酶活力的比较 .....	162
实验十九	血糖的定量测定——Hagedorn-Jensen 二氏 定糖法 .....	165
实验二十	胰岛素对血糖浓度的影响 .....	169
实验二十一	发酵过程中无机磷的利用 .....	170
实验二十二	脂肪酸的 $\beta$ -氧化 .....	173
实验二十三	精氨酸酶的作用 .....	176
实验二十四	氨基移换反应(一)——血液中转氨酶活力的测定 (分光光度法) .....	179
实验二十五	氨基移换反应(二)——谷丙转氨酶活性的测定 (纸层析法) .....	182
<b>第十三章</b>	<b>柱层析法的基本训练 .....</b>	<b>186</b>
实验二十六	用阳离子交换树脂摄取氯化钠 .....	186

### 第三篇 演示实验

实验二十七	聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳(血清蛋白的分离) .....	188
实验二十八	离子交换柱层析法分离氨基酸 .....	193
实验二十九	凝胶过滤法测定蛋白质分子量 .....	196
实验三十	血红蛋白的两性解离 .....	200
实验三十一	紫外分光光度法测定核酸的含量 .....	202
实验三十二	透析实验(一)蛋白质的透析 .....	204

实验三十三	透析实验(二)糖类的透析	205
实验三十四	锂盐存在时蔗糖的燃烧	207
实验三十五	用铂和血液过氧化氢酶分解过氧化氢	207
实验三十六	肝组织耗氧量的测定	209
实验三十七	用碳酸钙分离菠菜的色素	212
实验三十八	吸附层析法分离叶子色素	213
实验三十九	用 $^{32}\text{P}$ 测定小麦幼苗根部的吸收功能	215
实验四十	小白鼠氨中毒	217

## 附录.....219

### 一、实验室规则.....219

### 二、实验室基本操作.....220

#### (一) 玻璃仪器的洗涤.....220

#### (二) 搅拌和振荡.....221

### 三、常用仪器的使用.....222

#### (一) 容量玻璃仪器的使用方法.....222

#### (二) 台秤.....225

#### (三) 光学天平.....226

#### (四) 分光光度计.....229

#### (五) 电动离心机.....234

#### (六) 干燥箱和恒温箱.....235

#### (七) 电热恒温水浴.....237

#### (八) 电冰箱.....237

#### (九) 酸度计.....238

### 四、常用缓冲溶液的配制.....241

#### (一) 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液.....242

#### (二) 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液.....243

#### (三) 醋酸-醋酸钠缓冲液.....243

#### (四) 磷酸盐缓冲液.....243

#### (五) 巴比妥钠-盐酸缓冲液.....245

#### (六) Tris-盐酸缓冲液.....245

#### (七) 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液.....246

### 五、常用酸碱指示剂.....246

### 六、常用酸碱试剂的浓度及比重.....247



七、标准溶液的制备和标定.....	247
八、元素的原子量表.....	250
九、基础生物化学实验学生使用仪器清单(一组).....	251

# 第一篇 常用生物化学实验技术及原理

## 第一章 实验的准确性

准确性可以定义为与真实性一致的程度。因此，科学家们除正确设计实验之外，还要寻求在实验室中准确测量的方法以便获得准确的数据。我们把这些实际工作的概念写在第一章中，因为只有当准确性的要求达到以后，任何实际工作对于学生和阅读实验报告的人才有意义。在讨论有关的基本概念之前有必要先介绍在生物化学实验中常用的单位和量。

### 一、单位和量

本书所使用的单位是 SI 单位(国际单位制)，是以米制为基础的。SI 单位为全世界的科学实验室所普遍接受。1981 年 8 月公布的中华人民共和国计量单位名称与符号方案亦与国际单位制基本一致。

#### (一)基本单位

共有 7 种基本单位，均列在表 1-1 中。

表 1-1 基本单位

量	单 位 名 称	单 位 符 号
长度	米	m
质量	千克, (公斤)	kg
时间	秒	s
电流	安[培]	A
热力学温度	开[尔文]	K
物质的量	摩[尔]	mol
发光强度	坎[德拉]	cd

注: 表中单位名称, 去掉方括号时为单位名称的全称, 去掉方括号及其中的字即成为单位名称的简称; 无方括号的单位名称, 简称与全称同。圆括号中的名称与它前面的名称是同义词。下同。

## (二) 导出单位

除以上基本单位外, 还有一些因适当组合这些基本单位而得到的导出单位。为了方便起见, 这些导出单位都给以专门名称, 在生物化学工作中常遇到的导出单位列在表 1-2 中。

表 1-2 某些具有专门名称的导出单位

量	单 位 名 称	单 位 符 号
频率	赫[兹]	Hz
力	牛[顿]	N
压强, (压力), 应力	帕[斯卡]	Pa
能, 功, 热量	焦[耳]	J
功率, 辐[射]通量	瓦[特]	W
电量, 电荷	库[仑]	C
电位, 电压, 电动势, 电势	伏[特]	V
电容	法[拉]	F
电阻	欧[姆]	$\Omega$
摄氏温度	摄氏度	$^{\circ}\text{C}$



### (三)词头

有时单位太大或太小。此时,为了避免写许多0,可在单位符号前加一个词头。最好每一次单位改变的倍数为1000倍(表1-3)。如0.000015mol应写成 $15\mu\text{mol}$ 。13400m应写成13.4km。

表 1-3 词头

因 数	词 头 名 称		符 号
	原文(法)	中 文	
$10^6$	megá	兆	M
$10^3$	kilo	千	k
$10^{-1}$	deci	分	d
$10^{-2}$	centi	厘	c
$10^{-3}$	milli	毫	m
$10^{-6}$	micro	微	$\mu$
$10^{-9}$	nano	毫微	n
$10^{-12}$	pico	微微	p

词头和符号组合成为一个新符号。例如 $\text{mm}^3$ 的意思是 $(10^{-3}\text{m})^3$ 而不是 $10^{-3}\text{m}^3$ 。因此在书写时,词头和符号之间不应留有空格或缀以一点。反之,在导出单位中,符号之间则应留有空格,或者为了更清楚起见,加上一个点。例如:

$\text{ms} = \text{毫秒}, \text{即} 10^{-3}\text{s}$

而  $\text{m}\cdot\text{s} = \text{米}\times\text{秒}, \text{即} \text{m}\times\text{s}$

### (四)与 SI 并用的单位

在生物化学工作中有些比较方便而不能代替的单位,这些单位有时与 SI 单位并用。

1. 升(l) 在生物化学工作中用升作为体积基本单位。一升准确等于一立方分米。

所以:  $1000 \text{ 升} = 1 \text{ 立方米} = \text{m}^3$

$$1 \text{ 升(l)} = 1\text{dm}^3 = 10^{-3}\text{m}^3$$

$$1 \text{ 毫升(ml)} = 1\text{cm}^3 = 10^{-6}\text{m}^3$$

$$1 \text{ 微升}(\mu\text{l}) = 1\text{mm}^3 = 10^{-9}\text{m}^3$$

2. 克(g) 在生物化学中用克作为质量的基本单位。克有时和词头合用,如千克(kg),毫克(mg),微克( $\mu\text{g}$ )等。

3. 秒(s) 时间的基本 SI 单位为秒,但是通用的时间单位[即分(min)、小时(h)、日(d)]在方便时也可以用。

## (五)摩尔和浓度

### 1. 摩尔(mol):

摩尔是“物质的量”的单位。当物质含有  $6 \times 10^{23}$  个微粒时,这种微粒的物质的量称为 1 摩尔。微粒可以是原子、分子、离子以及其它粒子。1 摩尔任何物质的质量称为该物质的摩尔质量。某物质的摩尔质量就等于该物质的分子量以克为单位。例如

葡萄糖分子的摩尔质量(分子量 180)是 180g,

清蛋白分子的摩尔质量(分子量 68,000)是 68,000g 或 68 kg。

### 2. 摩尔浓度(摩尔/升或mol/l):

单位体积溶液中溶质的量叫做溶质的浓度。在生物化学工作中量的单位是摩尔,体积的单位是升。1 摩尔浓度因此定义为每升溶液中含溶质 1 摩尔。

$1\text{mol/l}$  = 每升溶液中含溶质的分子量以克为单位

摩尔浓度过去的符号是  $M$  ( $0.15M \text{ NaCl}$ ),但是国际单位制建议用  $\text{mol/l}$  代替 ( $0.15\text{mol/l NaCl}$ )。

### 3. 重量浓度:

有时待测的物质组分不明,如某种抽提液中的蛋白质或核酸的浓度,在这种情况下,用单位体积的重量而不是用摩尔来表示浓度。在生物活性物质的分子量还未查明的时候,如维生素  $B_{12}$  或

血清免疫球蛋白,也可以这样用。体积的单位还是升,因此所有的浓度都以升而不是以 100ml 为基础(g/l, mg/l,  $\mu$ g/l, 等)。仍然使用%这个术语,但必需意义明确(写入下列括号中的意义)。例如 2%醋酸溶液可能意味着:

每 100g 水中含 2g 醋酸(W/W)

每 100ml 水中含 2g 醋酸(W/V)

每 100ml 水中含 2ml 醋酸(V/V)

#### 4. 从摩尔浓度换算为每毫升的摩尔数:

在许多生物化学反应中需要知道试管中物质的摩尔数,它可从溶液的摩尔浓度和其体积来计算。首先需计算 1ml 溶液中物质的摩尔数,然后乘以试管中溶液的体积。如每次将摩尔数和体积各缩小  $10^3$  倍,绝对数就不变;这种关系在实际中很有用。

1 摩尔浓度溶液 = 1mol/l

= 1mmol/ml

= 1 $\mu$ mol/ $\mu$ l

同样,1 毫摩尔浓度溶液 = 1mmol/l

= 1 $\mu$ mol/ml

## 二、准确测量

### (一)误差来源

所有实验室工作都包含某些形式的测量。由于所有的测量都可能有误差,故应懂得这些误差的可能来源。

1. 个人误差:这可能来源于一个设计不好的实验,其中的控制实验不够。例如在许多生物实验中环境的温度和光照可能对所研究的系统有深刻的影响,因而必需小心地控制。设计实验时每



次应只引入一个变量而其他所有能影响实验的因素都保持恒定。

个人误差还常常来源于由视差引起的不正确读数。因此，在许多仪器上，都在指针的背面装一面镜子，这样当指针和其镜影重合时就可得到真实的读数。在某些仪器上则使用数字计数来代替刻度的反射。但是吸管刻度目前还只能用肉眼观察，而不正确地在吸管中液体的弯月面上读数可能是生物化学实验中误差最大的来源之一(图 1-1)。这类的个人误差可以通过仔细的工作加以纠正或消除。

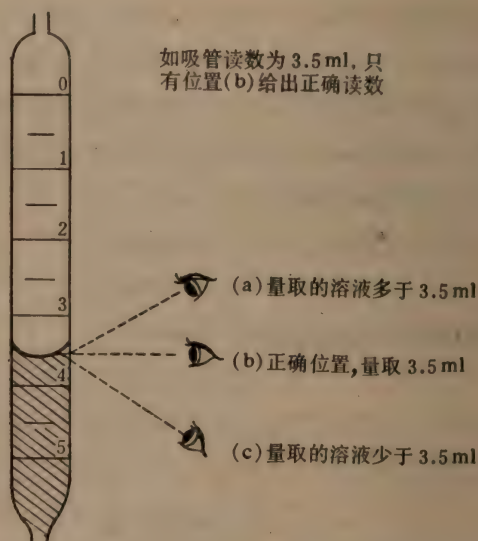


图 1-1 避免由于视差引起的错误

2. 仪器的局限：一种特殊装置的准确度的局限通常是已知的，在选择仪器时应考虑在内。例如 10ml 分度吸管的误差是 0.2%，这种吸管可以相当准确地转移较大量的液体，如 9.2ml，但要转移 0.1ml，其误差则可高达 20%。因此应根据实验的要求选择合适的量器，天平等。

### 3. 标准物和空白实验

为了在测量时尽可能得到准确的数值,必需使误差减至最小。可以通过仔细的工作和使用标准溶液做到这一点。在任何实验中,甚至在使用标定仪器和基准试剂时,都应使用待测物质的标准溶液。这种做法能对方法的准确性提供一种有用的检查,因为测量所得的数据必需落在真值范围之内。标准溶液应与所研究的溶液用完全相同的方法处理。此时可以画出一条能指示用浓度测量物质质量变的标准曲线。从待测液得到的数值应落在标准曲线范围之内,然后读出实验数值。通常在容量测定时只有一种标准物,可以预先画好标准曲线。

在任何测量实验中都应包括有空白溶液。用同体积的蒸馏水代替待测液并严格按照待测液和标准液那样的方法处理,即得所谓的空白溶液。当然,在最终计算时,应从实验值和标准值中减去从空白溶液中得到的任何数值,因为空白值是所用的试剂而不是待测物(所研究的物质)所造成的。在本书众多的比色测定中对空白和标准溶液的实际应用有很好的阐述。在酶的工作中常需用几个空白或对照溶液。

4. 偶然误差 还有一种无法预料的偶然误差。同一个实验者在同样条件下进行一系列测定时,每一次测量的结果都略有不同,这就是偶然误差所造成的。进行大量的测定并计算平均值(表 1-4)可以有效地减少偶然误差。如果测量结果相当一致的话,两次测定就够了,而这通常是在制定标准曲线时的情况。重复实验间的一致程度叫做精密度。精密度和准确度不是一个概念。因为测量可以高度精密但由于仪器或技术的误差而并不准确。

在许多情况下,精确度并不像例子(表 1-4)中那样高,实验结果要分散的多。因此,测量一下所得数据的分布是有益的。为此,应介绍统计学的一些概念。

表 1-4 血清中氯离子的测定

测 定 次 数	氯 化 物 (mmol/l)	
	实 验 值	平 均 值
1	102	102
2	104	103
3	106	104
4	104	104
5	103	104
6	105	104

以下从统计学原理所引出的方程式是作为工具使用的、公式的推导已略去。

## (二) 正态分布曲线

如果得到某种量( $x$ )的一大批数据,就可画出一个表示数据的数目与 $x$ 值关系的曲线(图 1-2)。这种实验结果的正态或 Gaussian 分布曲线有一些特征,即

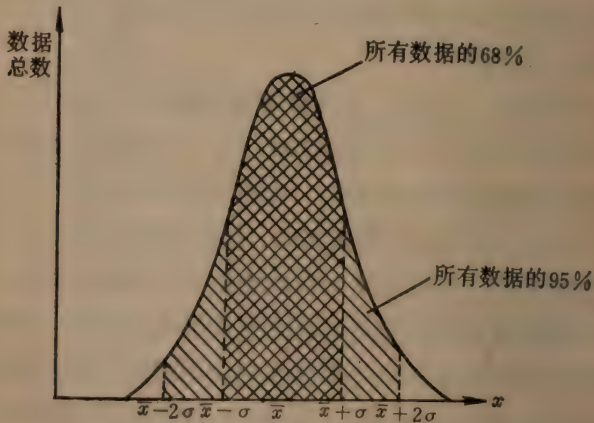


图 1-2 数据的正态或 Gaussian 分布

- ① 曲线是对称的, 其最大值为平均值  $\bar{x}$ 。



② 拐点为  $\bar{x} + \sigma$  和  $\bar{x} - \sigma$ , 所有数据的 68% 落在图中交叉影线范围  $\bar{x} \pm \sigma$  之间。

③ 所有数据的 95% 落在图中阴影范围  $\bar{x} \pm 2\sigma$  内, 99% 落在  $\bar{x} \pm 3\sigma$  范围内。

1) 标准偏差(SD):  $\sigma$  值是标准偏差。它是期望值的量度。能从单个的实验数据  $(x_1, x_2, x_3 \cdots x_n)$ , 所取数据的数目  $(n)$  和平均值  $(\bar{x})$  计算。

$$\bar{x} = (x_1 + x_2 + x_3 + \cdots + x_n) / n = \Sigma x_n / n。$$

如用  $d$  表示每个样本与平均值的偏差, 则

$$d_1 = x_1 - \bar{x}$$

$$d_2 = x_2 - \bar{x}$$

$$d_3 = x_3 - \bar{x}$$

$$\vdots = \vdots \quad \vdots$$

$$d_n = x_n - \bar{x}。$$

偏差的平方和叫做离差。离差除以样本数  $(n)$  得到方差  $(\sigma^2)$ 。

$$\sigma^2 = (d_1^2 + d_2^2 + d_3^2 \cdots \cdots + d_n^2) / n。$$

标准偏差  $(\sigma)$  是方差的平方根。除非进行无限次数的测量, 平均值  $\bar{x}$  与标准偏差  $(\sigma)$  就不能精确得知。在实践中只可能进行有限次数的测量, 但能从有限数量的数据除以自由度  $(n-1)$  而不是样本数  $(n)$  来算出总体方差的近似值。

计算单个数据与平均值的偏差太繁琐, 但可用以下的实验式从  $x$  的和  $(\Sigma x)$  及  $x^2$  的和  $(\Sigma x^2)$  来确定标准偏差。

$$\sigma^2 = \frac{\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2 / n}{n - 1}$$

2) 均值标准误差(SEM): 通常平均值是从单个数据得到的, 但是知道此值与总体的未知平均值偏离多少比知道实验结果的分布情况更重要。均值标准误差  $(\sigma_m)$  估量所测定的有限数量样本

与总体平均值的可能误差。

$$\sigma_m = \sigma / \sqrt{n}$$

从上式可以看出:样本的数量越多,SEM 越小,也越接近无限数据的“真实”平均值。

### (三)生物材料中数据的变化

一个物理量,如一种纯液体的密度或粘度,能在实验室中测定,并可将所获得的数据与正确的数据相比较。一些随机的变化也可以观察到。如小心从事,这些变化可以很小;因而只需测定少数几次,便可计算出平均值。生物学中的许多测定则不是这种情形。生物学中往往没有单个的“真实”值,而只有一定范围的“正常”值。许多测量遵循一个对称的“正态”分布,因而可以应用简单的统计学方法。此时,正常值通常从 $(\bar{x} - 2\sigma)$ 开始,延伸到 $(\bar{x} + 2\sigma)$ 为止,包括所有数据的 95% (图 1-2)。也有时可以看到一种“非对称的”分布,则需要更复杂的数学处理。

在一些生物化学实验中要知道一个实验是否引起一个测定量的显著变化或者所得数据是否来自偶然的机会是很重要的。一位英国的统计学家,他自称“学生”,发明一种简单的试验;用实验数据的分散情况来确定一个样本是否属于一个已知总体的几率。这种试验叫做“学生” $t$  试验。

上面已谈过,测量次数非常多时,平均值和总体的标准误差 $(\bar{x} \pm \sigma_m)$ 很接近。但是多数试验只包含相对少量的样本;而样本平均值( $m$ )和真实平均值的关系是:

$$m = \bar{x} \pm t \cdot \sigma_m \quad \text{或} \quad m = \bar{x} \pm t \cdot \sigma / \sqrt{n}$$

式中 $\sigma$ (或写作 $s$ )是样本的标准偏差而 $n$ 是测量的次数。

可利用自由度 $(n-1)$ 从统计学表格中查出 $t$ 的几率( $P$ 值)。几率为 0.05 意味着样本和总体相同的机会是 5%。如果 $t$ 值下降

到几率水平 0.01 以下,则意味着样本与总体相同的机会只有 1%。这两种水平通常是生物学中的“置信限度”。几率在 0.05 水平的实验结果被视为“显著”,几率在 0.01 水平则为“非常显著”。

进行有限次数测定的两种试样可以直接对比,利用下列方程式计算  $t$  值:

$$t = (\bar{x}_1 - \bar{x}_2) / \left\{ \frac{(n_1 - 1)\sigma_1^2 + (n_2 - 1)\sigma_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right) \right\}^{1/2}.$$

如果两种试样的测定次数相同 ( $n_1 = n_2$ ),则上式可简化为:

$$t = (\bar{x}_1 - \bar{x}_2) / \{ (\sigma_1^2 + \sigma_2^2) / n \}^{1/2}.$$

#### (四)容量玻璃仪器

严格认真地清洗和正确使用容量玻璃仪器,对于实验室工作的准确也是十分重要的,其具体操作方法见附录。

### 三、实验报告

获得了准确的实验结果还不是实验的结束。实验室工作目的是用一种明白易懂的方式向他人传播实验结果和所引出的概念。书写实验报告是对更严格地撰写科学论文的极好的练习。

#### (一)结果的记录

1. 实验本:最好用大的硬皮本写实验报告。用讲义夹和单篇的报告纸也可以,其好处是便于插入图表,缺点是容易遗失。

应把课程和实验名称、姓名、日期和页数写在实验报告上。课程完成后,还可编一个目录。

可以用不同的方式书写实验报告。下列各标题是在大多数生物化学研究论文中所使用的。在一些实验中也可以把两部分合并



为一个标题,如“方法和结果”或“结果与讨论”,将依不同的研究内容而定。

2. 题目和引言:所有的实验都有一个题目,它应该写在实验报告的顶端、与日期并列在一起。实验题目应该简洁而明确,使实验的目的一目了然。

学生应明确实验的目的,如能对在实验中试图证明的内容有一个粗略的描述就更好。

3. 材料和仪器:应列出所用的试剂和装置,特殊的仪器要有合适的图解,说明化学试剂时要避免未被普遍接受的商品名或俗名。

4. 实验或方法:要描述按操作顺序所进行的实际做法,不能照抄实验书或实验讲义。实验描述要简洁,但要写得明白,以便他人能够重复。

5. 结果:常希望能重复以前的某些实验结果,或此次的结果能在今后再现。因此应记录实际观察到的实验现象而不是照抄实验书所列应观察到的实验结果。应记录实验现象的所有细节。如只报告在一个特殊实验中生成一种黄色沉淀是不够的。沉淀的真实颜色是什么,亮黄、桔黄或其他?沉淀是多,是少,是胶状还是颗粒状?什么时候形成沉淀,立即生成、缓慢生成、热时生成还是冷却时生成?所有这些似乎都是显而易见的,但常常被忽视。报告在实验中的真实发现对学生将是非常重要的科学研究训练。在科学研究中仔细观察,特别注意未预期的实验现象是十分重要的,这些观察常常引起意外的发现,而且为了重复工作也需要准确的实验报告。

在实验报告中只写“处死大鼠并取肝”是十分不合适的,必需给出鼠的品种、性别、年龄和体重。鼠是饥饿的还是饱食的,……它是否用某种方式处理过?是如何处死它的?在评价实验结果时,

上述各种因素可能十分重要,因此必须记录。

6. 讨论和结论:讨论不应是实验结果的重述,而是以结果为基础的逻辑推论。常常在引言部分对实验提出问题,然后看在讨论中能对此问题回答到什么程度。

应有一简短而中肯的结论。

## (二)表格和图解

1. 表格 最好用图表的形式概括实验的结果,根据所记录数据的性质确定用图还是用表。表格应该连续标号并有明白的标题,有时还需要紧接在标题下面有一详细的说明。在每一纵行数据结果的顶端注明所使用的单位而不要在表格的每一行中都重复地书写数据的单位。表格中的数据应有合适的位数。可适当调整数据的单位做到此点。例如浓度  $0.0072\text{mol/l}$  最好在浓度( $\text{mmol/l}$ )的栏下表示为 7.2 或在  $10^{-4} \times$  浓度( $\text{mol/l}$ )的栏下表示为 72。

2. 图解 常常在实验报告中画上专门仪器的粗略草图。此外,用图线表示层析或电泳的结果或用流程图表示纯化的步骤也比冗长的描述更清楚。一般说,当所观察记录的数据较多时用图线比用表格好。从图中吸取结果也比从表中来得容易。而且观察各点是否能画成一个光滑的曲线还能给出实验中偶然误差的某些概念。此外,图能清楚地指出测量的中断而从数字表格中则不容易看出来。

3. 直线图 如  $y$  和  $x$  的关系和下列方程式类似:

$$y = mx + c$$

那么,以  $y$  对  $x$  作图就得到一条直线。直线的斜率是  $m$ ,它与  $y$  轴相交于  $c$ (图 1-3)。

在许多情况下, $y$  和  $x$  并不是线性关系,但对数据进行某种处理,仍可得到一条直线。本书中有这样处理数据以获得直线的例

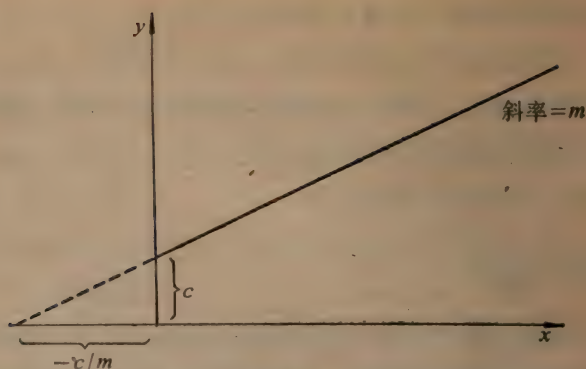


图 1-3 直线图( $y=mx+c$ )

子, 如 Beer-Lambert 定律和酶动力学。

4. 怎样画图 在许多实验中, 都有一个量, 如浓度、pH 或温度, 在系统地变化着, 要测量的是此量对另一量的影响。已知量叫做自变量, 未知量或待测量叫做应变量。画图时, 习惯把自变量画在横轴( $x$  轴)上而把应变量画在纵轴( $y$  轴)上。下面列举一些作图的提示:

- (1) 为了清楚起见, 调整标度使斜度在  $45^\circ$  范围内。
- (2) 图应有明白简洁的标题。清楚地标明两个轴的计量单位。
- (3) 最好用简单数字标明轴上的标度(如使用  $10\text{mmol/l}$  就比  $0.01\text{mol/l}$  或  $10,000\mu\text{mol/l}$  要好)。
- (4) 欲表示实验中所测定点的位置应用清楚设计的符号( $\circ$ ,  $\bullet$ ,  $\square$ ,  $\blacksquare$ ,  $\triangle$ ,  $\blacktriangle$ , ...)而不用  $\times$ ,  $+$ , 或一个小点。
- (5) 尽可能使各点间的距离相等, 不要使各点挤在一起或让它们之间的距离太大。
- (6) 根据不同的实验用光滑的连续的曲线或用直线连接各点。
- (7) 符号的大小应能指示各值的可能误差, 而且, 由于自变量常常知道得很准确, 有时也可以把结果表示为垂直的线或棒, 其长



度依赖于应变量的差异。

最后，图 1-4 指出怎样作图是不正确的。参考以上提示可以在图中找出 16 处错误。

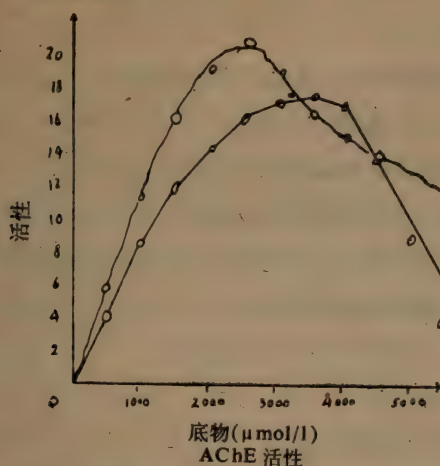


图 1-4 一个错误的曲线图

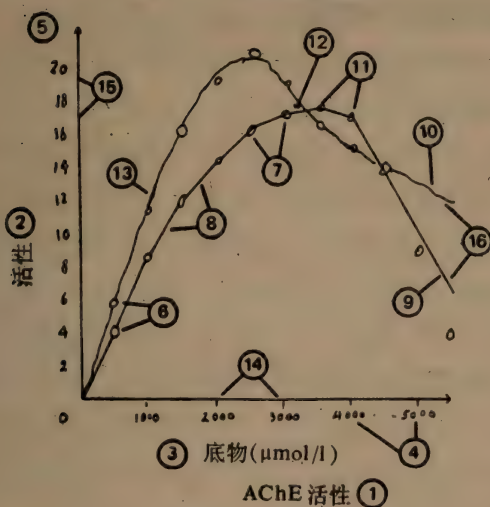


图 1-5 图 1-4 的错误

图 1-4 的错误:

- (1) 标题不明确。不能使用未加说明的缩写。
- (2) 活性没有单位。
- (3) 底物是什么?
- (4) 横轴的数字太大, 单位应用  $\text{mmol/l}$ 。
- (5) 纵轴的数字太多。
- (6) 两条曲线使用相同的符号。
- (7) 各点大小不均匀, 圆圈不整齐。
- (8) 应用光滑的曲线, 而不是用一系列的直线连接各点。
- (9) 曲线应该通过各实验点。
- (10) 曲线不应超越最后一个实验点。
- (11) 线不应穿过符号。
- (12) 是实验点还是污点?
- (13) 应用工具画一个光滑曲线而不是用手制图。
- (14) 刻度标号应画在图内。
- (15) 没有刻度标记。
- (16) 两条曲线表示什么?

## 第二章 透 析

透析是利用小分子能通过，而大分子不能通过半透膜的原理把它们分开的一种重要手段。通常的做法是将小分子和大分子的混合物放进用半透膜制成的透析袋里并沉没在大量的水中。袋内的小分子就不断通过膜进入外部溶剂中待达到平衡为止(图 2-1)。如果对流水透析或不断更换透析袋外的溶剂可以做到袋内的混合物几乎不含小分子。透析的速度受一些因素的影响。下面就粗略地讨论这些因素。

### 一、膜

(一)材料 火棉胶是最常用的透析袋材料。各种规格的火棉胶袋已作成商品出售。也可用玻璃纸代替火棉胶。

(二)制备 先将一适当大小和长度的透析管放在碱性EDTA溶液( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10 克/升, EDTA 1毫摩尔/升)中沸腾 30 分钟以避免待透析的分子损失活性。然后,用蒸馏水洗涤透析管。结扎管的一端并将所研究的材料充满透析管(袋),然后结扎顶部。透析最好在新制备的管中进行,因为湿的透析袋非常容易受微生物感染。如果必须保存透析袋,则应在溶液中加入痕量的苯甲酸。

(三)通透性 透析袋的通透性因袋的大小和预处理的方法不同而异。但透析过夜时,半透膜大体可以允许分子量 30,000 以下的化合物通过。实际上没有严格的界限,透析时间延长时稍大的分子也透过膜。有一系列的商品材料有更高的透析速度和更精细的通透范围可做精细分离之用。



## 二、溶 剂

(一)水溶液 一般说,透析的速度在蒸馏水中最大,虽然通常需要特定的 pH 和离子强度的水溶液来稳定所研究的分子。

(二)大分子溶液 透析时水将进入透析袋,因此总是将透析袋装满以避免透析的材料过于稀释。如果用一种不活泼的高分子化合物代替通常使用的水溶液作为溶剂,则透析时水就会由透析袋中渗出,用这种方法透析过夜,可将 200 毫升溶液浓缩至几毫升。

## 三、物 理 条 件

(一)温度 透析速度也受温度的影响,温度越高透析速度越快。提高温度时,溶剂的粘度降低而扩散速度增加。此外,许多大分子对温度很敏感,因此蛋白质等的透析通常在冷的条件下进行。

(二)压力 大分子和小分子的分离也受通过膜时的压力梯度影响。可将透析袋放在真空中(而不放在溶液中),并敞开透析袋的一端。此时水和小分子会渗出透析袋形成超滤液而留在透析袋中的大分子被浓缩。这个过程叫做超滤。

## 四、Donnan 膜 平 衡

当大分子(如蛋白质)的盐溶液透析时,带电的蛋白质不能透过膜而它的反离子则趋向于透过,这就导致离子在膜两边不均匀分布并产生 pH 的变化,这种现象叫做 Donnan 效应,常发生在对蒸馏水透析的时候。如带负电荷的蛋白质盐溶液对水透析时,蛋白质不能透过透析袋,而它的反离子( $\text{Na}^+$ )可以通过,结果造成环

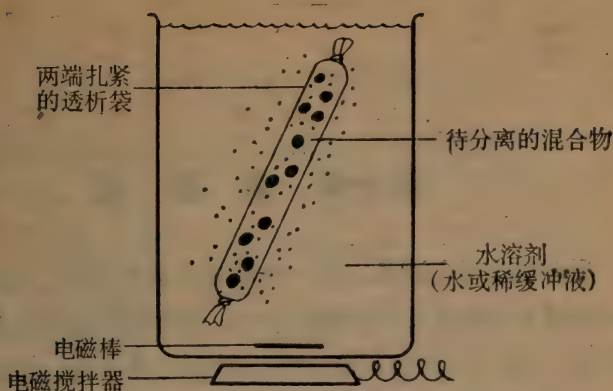


图 2-1 一个含有大(●)和小(·)分子的混合物的透析作用

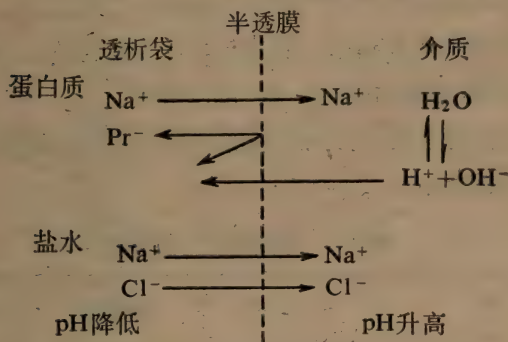


图 2-2 蛋白质的盐溶液对蒸馏水透析时所观察到的 Donnan 效应。

( $\text{Pr}^-$  代表蛋白质阴离子)

境介质中阳离子过多。为了保持中性，水就分解出氢离子移进透析袋，蛋白质部分的 pH 因此下降而水部分的 pH 上升(图 2-2)。反之，如蛋白质带正电，则 pH 的变化相反。Donnan 效应可以导致蛋白质沉淀或变性，因而是不可取的。为了减少 Donnan 效应，透析通常对具有适当浓度的盐溶液进行。

### 第三章 层析法

层析法也叫色谱法，是一种物理的分离方法。它是利用混合物中各组分的物理化学性质的差别，使各组分以不同程度分布在两个相中，其中一个相为固定的（称为固定相），另一个相则流过此固定相（称为流动相）并使各组分以不同速度移动，从而达到分离。

层析法是近代生物化学最常用的分析方法之一，运用这种方法可以分离性质极为相似，而用一般化学方法难以分离的各种化合物，如各种氨基酸、核苷酸、糖、蛋白质等。

层析法有许多种类，可以根据所用两个相的状态和操作方式不同进行分类如下：

表 3-1 层析法的一般分类

固 定 相	流 动 相	操作方式	名 称
固体 { 吸附剂 离子交换剂	液体	柱型	{ 吸附层析 离子交换层析
固体	液体	薄层	吸附薄层层析
液体	液体	柱型	分配层析
液体	液体	薄层	分配薄层层析
液体	液体	纸	纸层析
固体	气体	柱型	气体吸附层析
液体	气体	柱型	气体分配层析

此外，还有凝胶层析，亲和层析和高压液相层析等方法。

在讨论几种常用的层析法之前，先介绍一下柱层析法的一般技术。



## 一、柱层析法的一般技术

(一)柱 层析柱通常是玻璃的。总的说来,长柱分辨力好、但大量

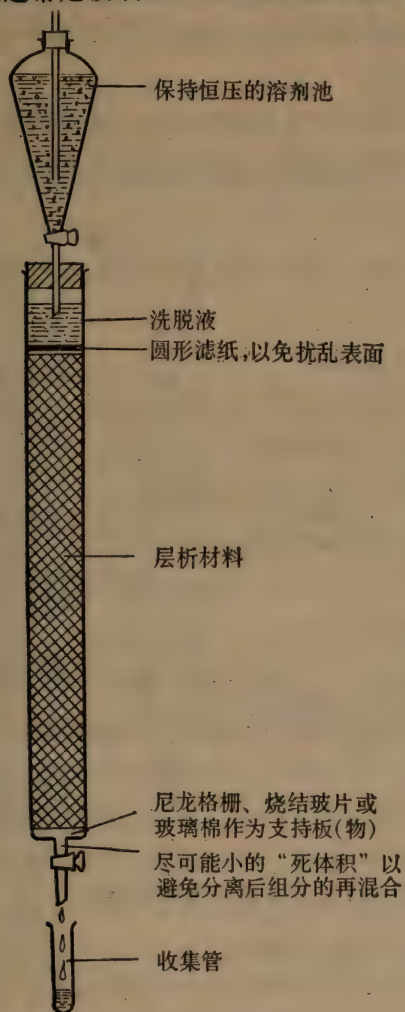


图 3-1 柱层析装置

物质的处理则用粗的柱比较适宜。层析柱的基本装置如图 3-1。

## (二) 层析材料的准备

许多材料都可在层析法中使用，在装柱前这些材料要用溶剂平衡，另外还需作一些预处理，例如凝胶层析材料需要溶胀，吸附剂需要加热或酸处理来活化，离子交换树脂需要用酸碱处理来得到所需的电离形式。

在用溶剂平衡时，先使材料沉淀，用倾泻法除去悬浮的细颗粒，否则由于细颗粒的堵塞，溶剂的流速将显著降低(图 3-2)。

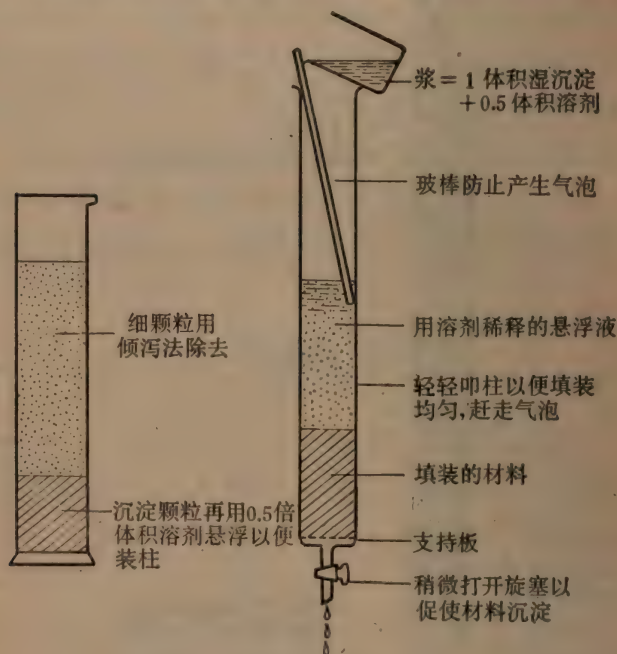


图 3-2 层析柱的制备

## (三) 装柱

层析柱的填装是先关闭出口，用溶剂灌注至1/3体积，并使支持板下的“死体积”不存有气泡，再慢慢地向溶剂中加浆状物，要小

心地沿着玻棒倾注以防止气泡存留在柱内。让悬浮液沉淀，并放出过多的溶剂，为了避免分层，最好一次装完，如需分几次填装，则在二次填装前应先已经在已经沉淀的表面用玻棒搅拌然后再倾注，重复这个过程，直至装到需要的高度。用溶剂彻底洗涤层析柱后使液面降到比层析床表面略高一点。最后复盖一张圆形滤纸或尼龙布，以免加样时扰乱床表面(图 3-1)。

#### (四) 加样

上柱前，先将样品溶解在溶剂里或对洗脱液透析，样品溶液的浓度应该尽可能高些，以减少样品溶液体积，使区带狭窄。将样品仔细加到层析床的表面，打开旋塞至液面与床面齐，然后连接溶剂池，保持一定高度的液面。

#### (五) 洗脱

下一步是用适当的洗脱液把各组分依次从柱上洗脱下来。

在取代扩展法中，溶剂与层析材料的相互作用比柱上的物质与层析材料的相互作用要强，于是与柱结合的分子被取代。每一个柱能结合多少物质都有一个限度(即总柱容量)。在取代扩展的情况下，样品上柱量差不多达到总柱容量的 50%，一般尚能完全分离。但是为了得到更好的分辨力，洗脱法更为可取。

洗脱法是最常用的方法。使用洗脱法，上柱量不超过总柱容量的 10%，溶剂与柱的相互作用比溶质与柱的相互作用弱，溶剂越过结合的分子，逐渐地将它们从柱上冲洗下来。在冲洗过程中各组分因为吸附力不同而逐渐分离。在一个组分被洗脱后可以更换洗脱液，这就是所谓的分步洗脱。另外，还有一个可行的方法是逐渐改变溶剂的性质，形成一个离子强度、pH 或极性的递增梯度从而使各组分依次被洗脱，这种方法叫梯度洗脱，它的优点之一是能够减少拖尾现象。

#### (六) 部分收集及分析



柱的流出液可以用人工的方法收集到一系列试管中或使用部分收集器。这种装置能使每一管按预定的时间或滴数收集流出液,然后自动移位,下一管再继续收集。洗脱完毕将已收集的许多部分流出液即可选用各种适宜的方法进行定量分析,并画出洗脱物的量对流出液体积的洗脱曲线。每一部分的蛋白质或核酸的含量可以让流出液通过一个流动小室测定其 280nm 或 260nm 的光吸收来进行连续监测。

## 二、几种常用的层析法:

### (一)吸附层析

这是首次由 Tswett 用来分离色素的层析方法。吸附剂的经典含义可以说成是一种表面具有吸附分子的特性的固体(特别是当它是多孔的和分得很细的时候)。如氧化铝、硅胶、活性炭等固体物质都具有吸附性能,可以将一些物质自溶液中吸附到它的表面。它和离子交换树脂不同,吸附剂表面和分子的吸引力理论上不含有静电力。吸附可以是非常特异的,以致于可以从一个混合物中选择性地吸附一种物质。用这种方法进行各种成分的分离是由它们被吸附剂所吸附的程度,以及它们在分离用的溶剂中的溶解度,这两个方面的差异所决定的。当然这些特点是由化合物的分子结构所决定的。

例如在柱吸附层析中,混合物的分离是在装有适当吸附剂的玻璃管的柱中进行的。混合物加到柱上,然后用一个适当的溶剂(或是混合溶剂)通过这个柱。混合物就随着溶剂的流动而逐渐分开。在最初,溶液刚倒在吸附柱上时,混合物全被吸附剂吸附在柱的上层,在继续加入溶剂冲洗时,管中就会连续不断地发生混合物

中各物质的溶解, 吸附, 再溶解, 再吸附的反复交替过程。如被吸附的某物质被溶剂溶解出来(解吸作用), 就随着向下面流动, 但又遇到新的吸附剂颗粒, 又把它从溶剂中吸附出来, 后面继续流下来的新溶剂又再把它溶解出来并被带着往下移动, 又再被吸附。就这样, 经过一段时间之后, 混合物中各物质都会从柱顶向下移动一段距离, 但是由于各物质被吸附剂吸附的程度以及它们被溶剂溶解的能力不同而向下移动的距离不同因此彼此分离。吸附性弱的, 就比较容易溶剂溶出, 又因为它再被吸附的力量比较弱, 所以在柱中移动的距离就大些。经过适当的时间后, 混合物中各物质就可以完全分开。

在它们被分离以后, 现在一般最常采用的方法是让柱继续展开, 用溶剂把被吸附的物质由吸附柱上冲洗出来, 从柱上流出的洗脱液必须分部地收集, 随后进行分析。

对任何一种特殊的吸附剂和溶剂洗脱系统的选择由所要完成的分离来决定。在选择吸附剂时必须小心, 因为有时一些吸附剂在分离时可引起某些化合物的降解。


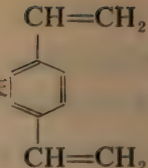
吸附层析的操作方式有柱型和薄层两种。具体操作技术请见本章。一、柱层析的操作和(五)薄层层析两部分。

## (二) 离子交换层析

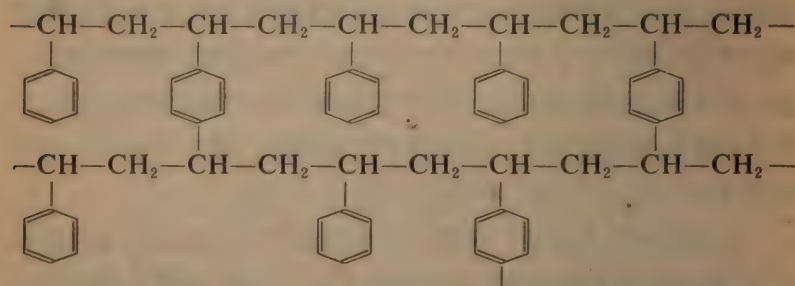
离子交换层析利用含有能跟周围介质进行离子交换的不稳定离子的不溶性基质来分离物质。

### 1. 离子交换基质

Adams 和 Holmes 在 1935 年通过酚、甲醛和磺酸缩聚成不溶性树脂, 制成了第一个人工合成的离子交换材料。从此以后, 人工合成的离子交换树脂日见增多(多数是从芳香族化合物合成

的), 由苯乙烯  及交联剂二乙烯苯  聚合得到

的物质是一种常用的树脂基质:



通过适当的反应再将可电离基团引入到芳香环上, 二乙烯苯和苯乙烯的相对含量决定了聚苯乙烯链之间的交联度。交联度是指这种树脂骨架中, 含有二乙烯苯的重量百分率。国产树脂的交联度一般为 4—14%。树脂的交联度小时, 则水溶性强, 加水后树脂的膨胀性大, 网状结构的网眼大, 交换反应快, 交换选择性低。相反, 树脂的交联度大时, 则水溶性弱, 加水后树脂的膨胀性小, 网眼小, 交换慢, 具有一定的选择性。

离子交换树脂适合分离小分子物质如氨基酸, 但对于大分子如蛋白质是不适合的, 因为大分子不能进入树脂紧密交联结构的内部。为此大分子可以用取代的纤维素和葡聚糖来分离, 这些物质的分子是纤维状的, 它们的大部分功能基团在其表面。

## 2. 可电离基团

离子交换树脂按照它们对阴离子或阳离子的亲合力的特性可以分为阴离子交换树脂和阳离子交换树脂。例如阳离子交换树脂交换周围介质的阳离子, 也就是说, 决定树脂究竟是阴离子的还



是阳离子的是树脂的可交换离子所带的电荷，而不是基质上所带的电荷。

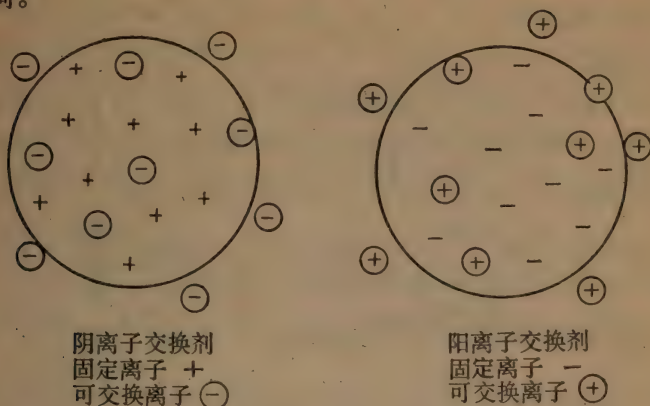
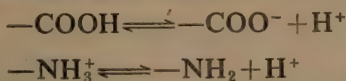


图 3-3 阴离子和阳离子交换剂

这两种类型又可进一步分成含有强电离基团的如 $-\text{SO}_3\text{H}$  (强酸型) 和 $-\text{NR}_3^+$  (强碱型) 及弱电离基团的如 $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$  (弱酸型) 和 $-\text{NH}_2$  (弱碱型)。强离子交换树脂是完全电离的, 并以带电形式存在 (在极端 pH 值时例外)



弱离子交换树脂所含基团的电离程度依 pH 而定, 仅在一个狭窄的 pH 范围有最大交换容量时方能使用。



一般含有羧基的树脂在 pH 6 左右有最大容量, 而带有氨基的那些树脂在 pH 低于 6 时才有效。

离子交换纤维素含有取代了纤维素 $-\text{OH}$ 的弱电离基团, 这些基团的密度比较低, 因为取代太多时就会使纤维素变得可溶。常见的可电离基团见下表

表 3-2 一些取代纤维素的可电离基团

可电离基团	名称	缩写	pK
阳离子交换剂			
$-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$	磺酸甲基	SM	2.5
$-\text{CH}_2-\text{COOH}$	羧甲基	CM	3.5
$-\text{PO}_3\text{H}_2$	磷酸基	P	6.0
阴离子交换剂			
$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N} \begin{matrix} \nearrow \text{C}_2\text{H}_5 \\ \searrow \text{C}_2\text{H}_5 \end{matrix}$	二乙基胺乙基	DEAE	9.5
$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+ \begin{matrix} \nearrow \text{C}_2\text{H}_5 \\ \searrow \text{C}_2\text{H}_5 \end{matrix}$	三乙基胺乙基	TEAE	10.0

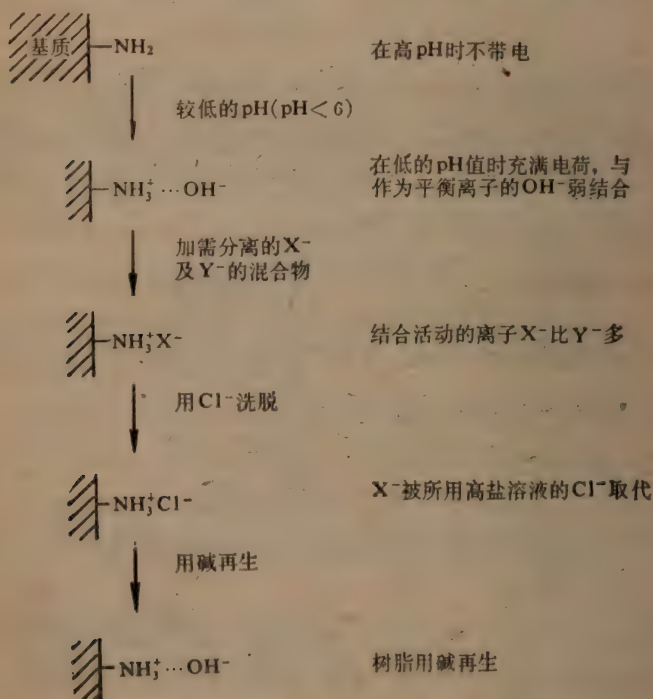


图 3-4 阴离子交换层析的各阶段

对于分离结合较弱的大分子，低密度的弱电离部位是适合的，而且在温和条件下容易解析。

### 3. 离子交换平衡

典型的离子交换反应过程可用下面的例子加以说明，在这里用含有氨基的阴离子交换树脂分离两个负电性离子  $X^-$  和  $Y^-$

树脂的可电离基团的浓度几乎可以达到6—10摩尔/升，因此有很高的交换容量。

虽然一般以为离子交换树脂的作用仅仅是通过离子交换过程来分离物质，而实际上也可能存在吸附作用和分子筛作用。

### 4. 结合离子的洗脱

结合离子可以通过改变缓冲液的 pH 来洗脱。例如当 pH 靠近一种蛋白质的等电点时，这种蛋白质分子的净电荷就减少，与树脂的结合就减弱而被洗脱，别的带电的蛋白质仍然结合在柱上，这样就达到了分离的目的。另外溶剂中的离子要与结合离子对离子交换剂的可电离基团发生竞争，溶剂中的离子浓度高时，就会取代结合离子，所以增加离子强度也可将结合离子洗脱。

pH 或离子强度可以通过更换洗脱缓冲液陡然地改变，也可用前面介绍的梯度方法逐渐地改变。

离子与树脂的结合是一种动态平衡，其结合程度取决于树脂的性质、温度、离子强度和溶剂成分，同时还与树脂的电离度和被分离的物质有关。高价离子最容易结合而不易洗脱，对于典型的强酸性阳离子交换树脂来说  $H^+ < Na^+ < Mg^{2+} < Al^{3+} < Th^{4+}$ ，所以在用一种高价离子取代结合离子时应使用稀溶液，而如果要导入一种低价离子则需用浓溶液。

### 5. 离子交换材料的准备

树脂和取代多糖(取代纤维素、取代葡聚糖)首先要在蒸馏水中吸涨，并去掉过细的颗粒。商品树脂，特别是阳离子交换剂会



含有铁或其它重金属, 可以用 2—4 摩尔/升的盐酸洗涤加以去除。

通过用适当的溶液洗涤可获得所需要的离子形式的离子交换材料。例如氢型的阳离子交换树脂是先用盐酸洗涤, 然后用水洗涤直至流出液呈中性为止, 同样制备钠型是用氯化钠或氢氧化钠溶液洗涤树脂, 再用水洗涤至中性。

装柱前的最后一步是用洗脱缓冲液平衡树脂, 显然缓冲离子必须是不跟树脂结合的。

6. 离子交换层析的操作技术请详见本书第三篇实验二十八离子交换柱层析法分离氨基酸。

### (三)分配层析

易溶于有机溶剂而难溶于水的混合物的分离常用吸附层析法。可电离的水溶性混合物最适宜用离子交换层析法分离。分配层析法是介于这二者之间, 在水和有机溶剂中都可溶的混合物用分配层析法易分离。

当把一种物质在两种不混溶的溶剂中振荡时, 它将在这两相中不均匀的分配。达到平衡时, 这种物质在两种溶剂中的浓度之比是一个常数, 也就是所谓的分配系数( $\alpha$ )。

$$\alpha = \frac{\text{物质在溶剂 I 中的浓度}}{\text{物质在溶剂 II 中的浓度}}$$

分配层析法实际上是一种连续抽提法。在这里, 一种溶剂通常是被结合在固定的惰性支持物(柱或膜)上的水, 另外一相由流动的被水饱和的有机溶剂构成, 它流过固定相, 如果某一混合物的各组分在这两相中的分配系数有足够的差异, 它们就可以被分离。

1. 纸层析的理论 Consden, Gordon 和 Martin 首先用滤纸作支持物并以茚三酮为灵敏显色剂, 建立了微量而简便的分离蛋

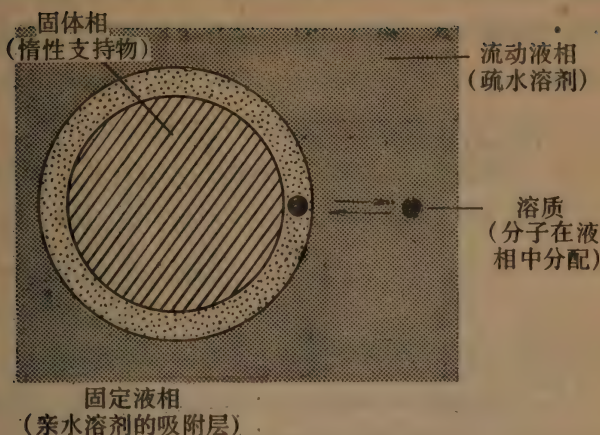


图 3-5 液-液分配层析的原理

白质水解液中氨基酸的方法。不久又发现除了氨基酸外，糖、核苷酸、甾体激素、维生素、抗生素等很多物质都能用纸上层析法分离，因而纸层析成为生化工作中一种常用的分离分析方法。

滤纸是理想的支持介质，在纸上，水被吸附在纤维素的纤维之间形成固定相。由于纤维素上的羟基具有亲水性，和水以氢键相连，使这部分水不易扩散，所以能与跟水混合的溶剂仍然形成类似不相混合的两相。当有机相沿纸流动经过层析点时，层析点上溶质就在水相和有机相之间进行分配，有一部分溶质离开原点随有机相移动而进入无溶质的区域，这时又重新进行分配，一部分溶质从有机相进入水相。当有机相不断流动时，溶质就沿着有机相流动的方向移动，不断进行分配。溶质中各组分的分配系数不同，移动速率也不同，因而可以彼此分开。

纸上层析法的一般操作是将混合物点到纸上，干后让溶剂从有样品的一端经毛细作用流到纸的另一端。等纸干后，可用适当的显色方法使混合物中各组分在纸上的位置显示出来，物质移动

的距离与溶剂移动距离之比就是  $R_f$  值。某一种物质在特定的溶剂系统、纸、展层方式、温度、pH 等条件下的  $R_f$  值基本上是个常数(图 3-6)。

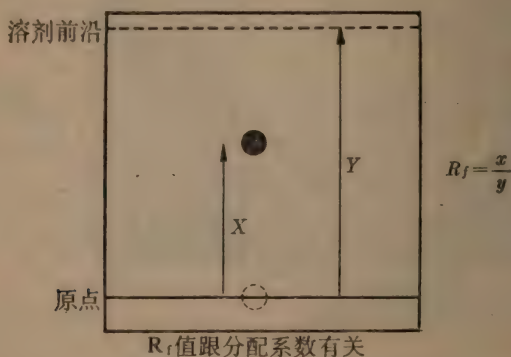


图 3-6 纸层析中  $R_f$  值的意义

$R_f$  与  $\alpha$  的关系如下式:

$$\alpha = \frac{A_l}{A_s} \left( \frac{1}{R_f} - 1 \right)$$

$A_l$ : 流动相的横截面积

$A_s$ : 固定相的横截面积

如果固定相不完全是惰性的, 那末既发生分配, 又有吸附作用和可能的离子交换, 这个等式就会有例外。

## 2. 样品的制备和点样

在研究生物材料时, 做层析以前样品要脱盐(用离子交换或电渗析), 过量的盐会使层析谱扩散和  $R_f$  值的改变, 同时还会影响辨认分离组分的化学反应。在层析前还可利用超滤或葡聚糖来除掉蛋白质。然后用微量点样管将样品溶液(2—20微升)点于纸上, 点的直径不超过 0.3~0.5 厘米, 如样品太稀, 需重复点几次时每次点之前均应吹干, 点间距离约 2—3 厘米。

## 3. 纸的选择



滤纸的质地必须均一、平整及厚薄均匀，要有一定的强度，一般分析工作可采用新华 1 号滤纸(或 Whatman 1 号)，若有较多的样品需要在纸上分离提纯则采用新华 3 号(或 Whatman 3 号)厚纸较合适，可是其分辨力比 1 号差。

溶剂顺着纸的纹道扩展速度快，横纹则速度慢。

必要时，使用前可将滤纸用缓冲液浸泡或经乙酰化作用进行化学修饰。

#### 4. 溶剂的选择

溶剂的选择跟纸的选择一样，主要是根据经验，同时也取决于所要分析的物质。如果在溶剂 A 中样品物质移动离溶剂 A 的前沿近，那就是溶解度太大；如果在溶剂 B 中它们靠近原点周围，那就是溶解度不够大，因而合适的溶剂应该是 A 和 B 的适当的混合物，以使样品各组分的  $R_f$  值能在整个纸的长度上散布开。在某些分离中 pH 是一个重要因素，很多溶剂含有乙酸或氨以形成一个酸性或碱性的环境。

#### 5. 展层

虽然展层方式可以不同，但其共同点都是将点好样品的滤纸固定，使其一边与溶剂槽接触，让溶剂扩展，整个装置扣在密闭的

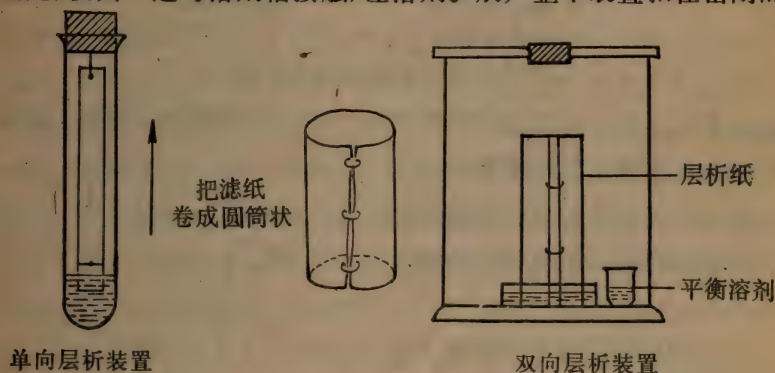


图 3-7 上行层析装置

容器内，槽壁衬垫浸透溶剂的滤纸以保持恒定的蒸气压并且放在恒温室里，温度的波动会使溶剂走得不均匀，并改变  $R_f$  值。

展层方式有上行、下行和环行。

上行层析见上图

上行层析是比较常用的方法，它的优点是可以在两个方向上进行(即双向层析)图(3-8)。混合物在第一种溶剂中被分离(溶剂

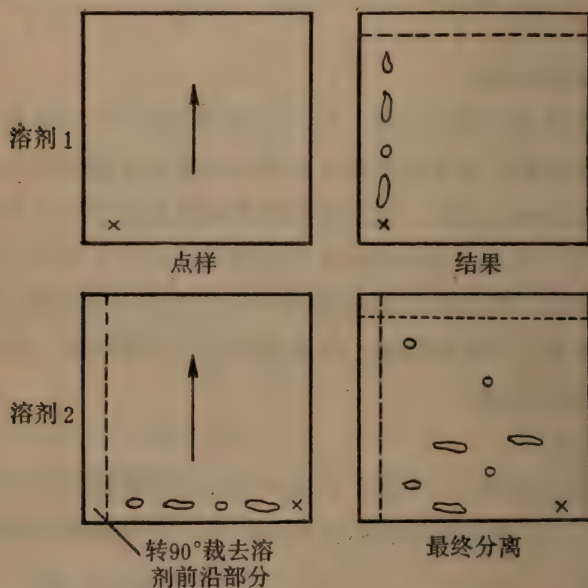


图 3-8 用双向纸层析分离混合物

应是挥发性的)，干燥后将纸转  $90^\circ$ ，再在第二种溶剂中进行。显色或用其它方法定位后得到的层析图谱跟在相同条件下已知物的层析图谱比较就能鉴定混合物的各组分。

下行层析适用于一些  $R_f$  值接近的混合物(图 3-9)。

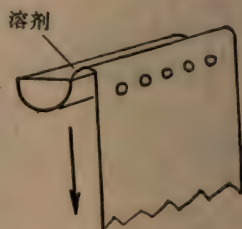


图 3-9 下行层析

因为溶剂滴离纸的底部，这就能使两组分较充分地分离。当然在这种情况下不能测定  $R_f$  值，而只能与标准参考物如葡萄糖相比较，就糖来说：

$$R_g = \frac{\text{未知糖移动的距离}}{\text{葡萄糖移动的距离}}$$

## 6. 显色

大部分化合物是无色的，可以用特殊的显色剂使其显色，配制显色剂时最好使用与水不混溶且挥发性较大的溶剂。显色剂可用喷雾器喷雾或迅速将纸在显色剂中浸渍。

如果被分离物质本身具有紫外吸收性质，可在紫外线照射下与纸的荧光背景对照显出暗的斑点。另外有些化合物在紫外线下发出特殊的荧光。

## (四) 薄层层析

Измайлов 和 Шрайбер 在 1938 年叙述了植物萃取物在氧化铝薄层上的分离，但是直到 1956 年以后薄层层析才逐渐引起各方面的注意和重视。

薄层层析法是将支持物在玻璃板上均匀地铺成薄层，把待分析的混合物加到薄层上，然后选择合适的溶剂进行展开，而达到分离鉴定的目的。薄层层析兼有柱层析和纸层析的优点。它操作方便，设备简单，展开时间短，一般只需几分钟到几十分钟。它灵敏度高，适用于微量样品的分析（小到 0.01/毫克），但是加大薄层的厚度则又能分离较多（大到 500 毫克）的样品。薄层层析还有一个优点是除了可用一般显色剂外，对某些薄层材料还可用腐蚀性显色剂，另外，还可以在支持物中加荧光染料以有助于点的鉴别。

薄层层析法分离物质的原理依所用不同支持物的性质而不同，可以是吸附层析、离子交换层析、分配层析或是凝胶过滤。



## 1. 薄层的制作

在玻璃板上涂铺一层薄层，最简单的方法是在一根玻璃棒的两端绕几圈胶布，用玻棒压在玻板上，把支持物向一个方向推动，即成薄层。

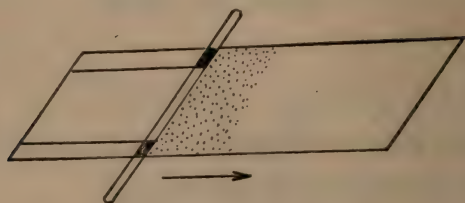


图 3-10 用玻棒涂铺薄层

有时用上述方法制得的薄层不太均匀，可以用有机玻璃自制一个涂铺器即能取得满意的结果。

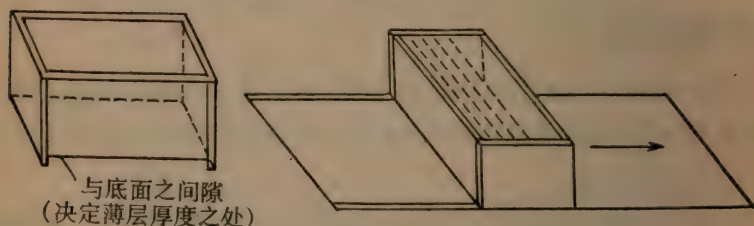


图 3-11 自制薄层涂铺器及其使用

薄层厚度小于 200 微米时，影响  $R_f$  值，一般情况下厚度为 250 微米比较合适。

可做薄层材料的物质很多，例如硅胶，氧化铝、纤维素粉、DEAE 纤维素、葡聚糖等，具体选择哪一种依所研究的问题而定。硅胶对大多数的物质分离都是适宜的。

有时在硅胶中加入煅石膏作为粘合剂。这时一旦与水调合就需快速操作。

## 2. 展开

薄层层析的加样与纸层析基本相同，薄层的展开需在密闭的器皿中进行，溶剂必须达到饱和，可以在器皿内部贴上浸湿了溶剂的滤纸条。薄层层析的展开方式跟纸层析一样，可以是上行、下行、单向或双向。下图是上行法的一种方式。

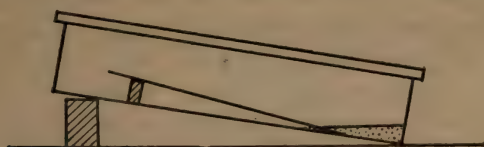


图 3-12

### 3. 定位

跟纸层析一样，可用适当的显色剂喷雾或根据组分的紫外吸收或荧光来定位。在有放射性物质时用扫描来定位。

## (五) 凝胶层析

1. 凝胶层析法也叫凝胶过滤是六十年代发展起来的一种简便有效的生物化学分离分析方法。这种方法的基本原理是用一般的柱层析方法使分子量不同的溶质通过具有分子筛性质的固定相(凝胶)，从而使物质分离。

用作凝胶的材料有多种，如交联葡聚糖、琼脂糖、聚丙烯酰胺凝胶、聚苯乙烯和多孔玻璃珠等。现以利用交联葡聚糖，分离物质和测定分子量为例说明凝胶层析法的基本原理和应用。

交联葡聚糖(商品名Sephadex)是由细菌葡聚糖(以右旋葡萄糖为残基的多糖)用交联剂环氧氯丙烷交联形成的具有三空间的网状结构物。控制葡聚糖和交联剂的配比及反应条件就可决定其交联度的大小(交联度大，“网眼”就小)，从而得到各种规格的交联葡聚糖，即不同型号的凝胶。“G”表示交联度，G越小，交联度越大，吸水量也就越小。(见表 3-3)。

表 3-3 Sephadex 的技术数据

型号	工作范围 ( $M_w$ )		得水值 (g/g干胶)	床体积 (ml/g干胶)	最小溶胀时间(小时)	
	多糖	肽与蛋白质			室温	沸水浴
G10	<700	<700	$1.0 \pm 0.1$	2—3	3	1
G15	<1500	<1500	$1.5 \pm 0.2$	2.5—3.5	3	1
G25	700—5000	1000—5000	$2.5 \pm 0.2$	4—6	6	2
G50	500—10000	1500—30000	$5.0 \pm 0.3$	9—11	6	2
G75	1000—50000	3000—70000	$7.5 \pm 0.5$	12—15	24	3
G100	1000—100000	4000—150000	$10.0 \pm 1.0$	15—20	48	5
G150	1000—150000	5000—400000	$15 \pm 1.5$	20—30	72	5
G200	1000—200000	5000—800000	$20 \pm 2.0$	30—40	72	5

把经过充分溶胀的凝胶装入层析柱中,在加入样品以后,由于交联葡聚糖的三维空间网状结构,小分子能够进入凝胶,比较大的分子则被排阻在交联网状物之外,因此各组分在层析床中移动的

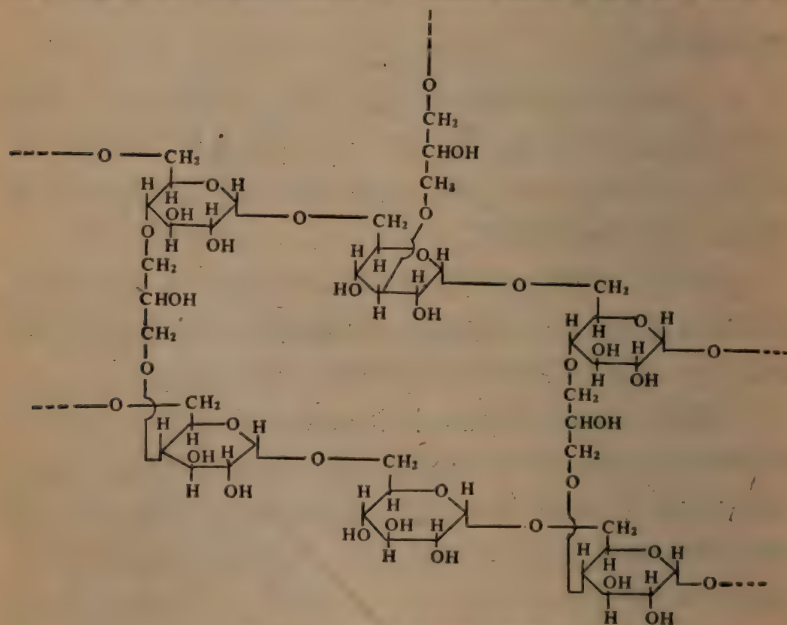


图 3-13 交联葡聚糖的化学结构



速度因分子的大小而不同(图 3-13)。分子量大的物质只是沿着凝胶颗粒间的孔隙随溶剂流动,其流程短,移动速度快,先流出层析床。分子量小的物质可以透入凝胶颗粒,流程长,移动速度慢,比分子量大的物质迟流出层析柱。经过分部收集流出液,分子量不同的物质便互相分离(图 3-14) Sephadex G10 到 G50 通常用于分离肽或脱盐。G75 到 G200 可用于分离分子量大于 10000 的蛋白质。

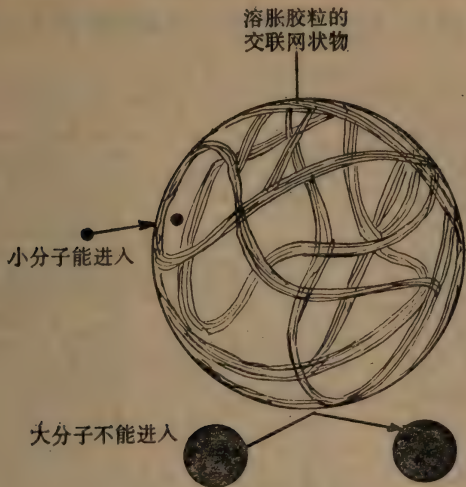
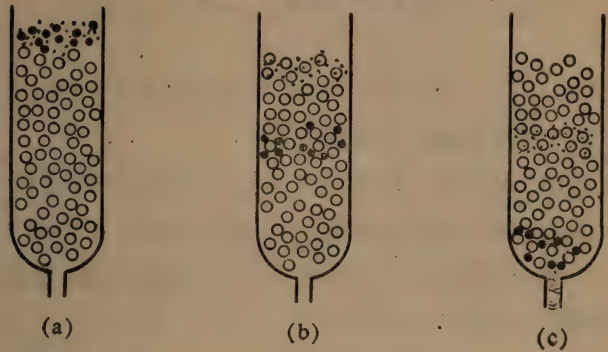


图 3-14 凝胶过滤的原理



- 凝胶颗粒
- 大分子
- 小分子

图 3-15 凝胶层析原理

交联葡聚糖分子含有大量的羟基,极性很强,易吸水,所以使用前必须用水充分溶胀。1克干重凝胶充分溶胀时所需的水量(毫升)叫做凝胶的得水值( $W_r$ ),因为得水值不易测定,故常用溶胀度即床体积来表示凝胶的得水性,其定义是每克干重凝胶颗粒在水中充分溶胀后所具有的凝胶总体积。

2. 凝胶柱的总体积(总床体积) $V_t$ 是干胶体积 $V_g$ ,在凝胶颗粒内部的水的体积 $V_i$ 及凝胶颗粒外部的水的体积 $V_o$ 之和。

$$V_t = V_o + V_i + V_g$$

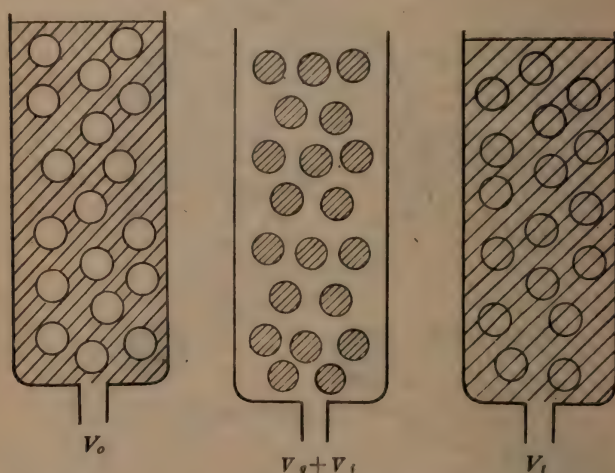


图 3-16  $V_o$ 、 $V_g$ 、 $V_i$  和  $V_t$  之间的关系示意图,斜影部分表示水。

$V_t$  也可从柱的直径及高度计算。

$V_o$  也叫外水体积。常常用洗脱一个已知完全被排阻的物质(如蓝葡聚糖 2000)的方法来测定,此时其洗脱体积就等于  $V_o$ 。

$V_i$  叫做内部体积或内水体积,可以从凝胶干重(毫克)和得水值  $W_r$  计算:

$$V_i = mg \cdot W_r$$

$V_t$  也可以从洗脱一个小于凝胶工作范围下限的小分子化合

物如铬酸钾来测定，其洗脱体积等于  $V_i + V_o$ 。

某一物质的洗脱体积  $V_e$  为：

$$V_e = V_o + KdV_i$$

$Kd$  为溶质在流动相和固定相之间的分配比例(分配系数)，每一溶质都有特定的  $Kd$  值，它与层析柱的几何形状无关。

根据上式

$$Kd = \frac{V_e - V_o}{V_i} = \frac{V_e - V_o}{mg \cdot W_r}$$

如果分子完全被排阻，则  $Kd=0$ ， $V_e=V_o$ 。如果分子可以完全进入凝胶，那末  $Kd=1$ ， $V_e=V_o+V_i$ 。在通常的工作范围内  $Kd$  是一个常数 ( $0 < Kd < 1$ )，有时  $Kd$  可能大于 1，则说明发生了凝胶对溶质的吸附。

溶质的洗脱特征的有关参数 ( $V_e/V_o$ ,  $V_e/V_i$ ,  $Kd$ ,  $K_{av[1]}$ ) 都与

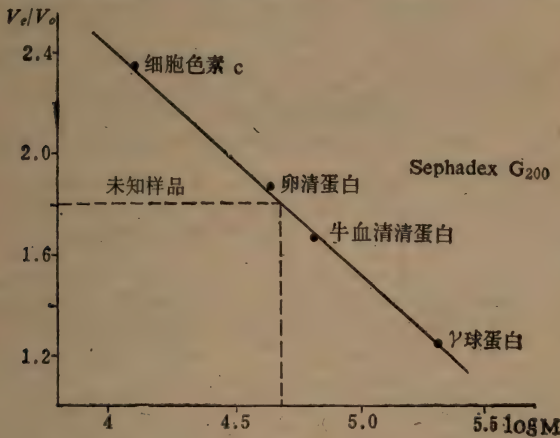


图 3-17 洗脱特征与分子量的关系

① 由于  $V_i$  不易正确测定，而  $V_o$  所造成的偏差不大，若把整个凝胶相都作为固定相，则分配系数以  $K_{av}$  表示

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_i - V_o}$$



溶质分子量成对数关系，因此洗脱几个已知分子量的球蛋白，用  $V_e/V_o$  对  $\log M$  作图，然后在同样条件下洗脱未知样品，从其  $V_e/V_o$  值，在图上即可找出相对应的  $\log M$ ，从而进一步算出其分子量。

不同规格的凝胶都有其一定的工作范围，一般说，在工作范围之内所得的曲线是线性的，超出工作范围曲线就不成线性。

## 第四章 电泳技术

带电质点在电场中移动的现象称为电泳。电泳现象早在十九世纪初期就被人们发现了,并用于胶体化学中,但是电泳技术的广泛应用则在二十世纪四十年代左右。近年来各种类型的电泳技术,发展十分迅速。例如纸电泳、醋酸纤维薄膜电泳、纤维素或淀粉粉末电泳、淀粉凝胶电泳、琼脂糖凝胶电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳、线丝电泳等。在电泳形式上更是丰富多样,有在溶液中进行的,有将支持物做成薄膜或薄层的,也有平板的或柱状的。由于与光学系统和自动分部收集器相结合,又组成了等电聚焦仪,等速电泳仪等等,大大地发展和扩大了电泳技术的应用范围。

各种类型的电泳技术概括如下表:

表 4-1 电泳技术的种类

类 别	名 称	型 式
不用支持物的电泳技术	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Tiselleus 式微量电泳</li> <li>2. 显微电泳</li> <li>3. 等电聚焦电泳技术</li> <li>4. 等速电泳技术</li> <li>5. 密度梯度电泳</li> </ol>	属自由电泳
用支持物的电泳技术	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 纸上电泳</li> <li>2. 醋酸纤维薄膜电泳</li> <li>3. 薄层电泳</li> <li>4. 非凝胶支持物区带电泳 支持物有:淀粉、纤维素粉、玻璃粉、硅胶,合成树脂粉末</li> <li>5. 凝胶支持物区带电泳 (1) 淀粉凝胶</li> </ol>	<p>包括常压、高压电泳 (水平式或垂直式)</p> <p>水平式或垂直式 (平板法、柱状法及线丝法)</p>

类 别	名 称	型 式
用支持物的电泳技术	(2) 聚丙烯酰胺凝胶 1) 圆盘电泳法 2) 平板电泳法 3) SDS-圆形电泳法 (3) 琼脂糖凝胶电泳 (4) 琼脂凝胶电泳	垂直式(柱状法) 垂直式或水平式 垂直式(测分子量) 平板法或柱状法 (如免疫电泳)
用 法	1. 双向电泳 2. 电泳-层析相结合技术 3. 交叉电泳法 4. 连续纸电泳	

## 一、电泳技术基本原理

任何一种物质的质点, 由于其本身在溶液中的解离或由于其表面对其他带电质点的吸附, 会在电场中向一定的电极移动。例如氨基酸、蛋白质、酶、激素、核酸及其衍生物等物质都具有许多可解离的酸性和碱性基团。它们在溶液中会解离而带电。一般说来, 在碱性溶液中 (即溶液的 pH 值大于等电点 pI), 分子带负电荷, 在电场中向正极移动。而在酸性溶液中, 分子带正电荷, 在电场中向负极移动。移动的速度取决于带电的多少和分子的大小。

不同的质点在同一电场中泳动速度不同, 常用泳动度 (或迁移率) 来表示。泳动度的定义是带电质点在单位电场强度下的泳动速度。即:

$$u = \frac{v}{E} = \frac{d/t}{V/l} = \frac{dl}{Vt} \text{ (厘米}^2\text{/伏特} \cdot \text{秒或分)}$$

式中:  $u$  为泳动度 (厘米<sup>2</sup>/伏特·秒或分)



$v$  为质点的泳动速度(厘米/秒或分)

$E$  为电场强度(伏特/厘米)

$d$  为质点泳动距离(厘米)

$l$  为支持物的有效长度(厘米)

$V$  为加在支持物两端的实际电压(伏特)

$t$  为通电时间(秒或分)

通过测量  $d$ 、 $l$ 、 $V$ 、 $t$  便可计算出质点的泳动度。

泳动度首先取决于带电质点的性质,即质点所带净电荷的量,质点的大小和质点的形状。一般来说,质点所带净电荷越多,质点直径越小,越接近于球形,则在电场中的泳动速度越快;反之则越慢。泳动度除受质点本身性质的影响外,还受其他外界因素的影响,如溶液的粘度等。影响泳动速度的主要外界因素还有下列几种:

### (一)、电场强度(电势梯度)

电场强度是指每 1 厘米的电压降,它对泳动速度起着十分重要的作用。例如,纸上电泳的支持物滤纸两端相距 20 厘米,如电压降为 200 伏特,则电场强度为  $200 \text{ 伏特} / 20 \text{ 厘米} = 10 \text{ 伏特/厘米}$ 。电场强度越高,带电质点移动速度越快。根据电场强度的大小,可将电泳分为常压(100~500 伏)电泳和高压(500~10,000 伏)电泳;常压电泳的电场强度一般为 2—10 伏特/厘米,电泳分离时间较长,需要几小时到几天;高压电泳的电场强度为 20~200 伏特/厘米,电泳分离时间比较短,有时仅需几分钟。常压电泳多用于分离蛋白质等大分子物质,而高压电泳则用来分离氨基酸、小肽、核苷酸等小分子物质。在生产中有时需要进行快速的中间分析,如果没有高压电泳设备,可以把常压电泳小型化,缩短滤纸两端距离,达到高压快速的目的。如将原来两端相距 20 厘米的滤纸改为 5 厘米,外加电压仍为 200 伏特,电场强度则变为 40 伏特/厘米,这样

就加快了电泳速度。

## (二)、溶液的 pH 值

溶液的 pH 值决定带电质点解离的程度，也决定物质质点所带净电荷的多少。对蛋白质、氨基酸等两性电解质而言，pH 值距等电点越远，质点所带净电荷越多，泳动速度也越快；反之，则越慢。因此，当分离某一蛋白质混合物时，应选择一个合适的 pH 值，使各种蛋白质所带净电荷的量差异较大，以利于分离。为了使电泳过程中溶液的 pH 值恒定，必须采用缓冲溶液。

## (三)、溶液的离子强度

离子强度代表所有类型的离子所产生的静电力，也就是全部的离子效应，它取决于离子电荷的总数，而与溶液中盐类的性质无关。溶液的离子强度越高，带电质点的泳动速度越慢；离子强度越低，质点泳动的速度越快。一般最适合的离子强度在 0.02~0.2 之间。

在稀溶液中，离子强度的计算方法，是将每一离子浓度乘以其价数的平方，再将所有乘积相加，以 2 除其和。计算公式如下：

$$\text{离子强度}(I) = \frac{1}{2} \sum CZ^2$$

式中：C 为离子的摩尔浓度(摩尔/升)

Z 为离子的价数

例如：求 0.015 摩尔/升  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  溶液的离子强度，则：

$$\text{离子强度}(I) = \frac{1}{2} (0.015 \times 2 \times 1^2 + 0.015 \times 2^2) = 0.045$$

根据离子强度(I)的计算公式单单价化合物的离子强度等于其浓度；双双价化合物的离子强度等于其浓度的四倍；单双价(或双单价)的离子化合物的离子强度等于其浓度的三倍。

#### (四)、电渗现象

液体在电场中对于一个固体支持物的相对移动。称为电渗现象(图 4-1)。例如在纸电泳时,由于纸上带有负电荷,而与纸接触

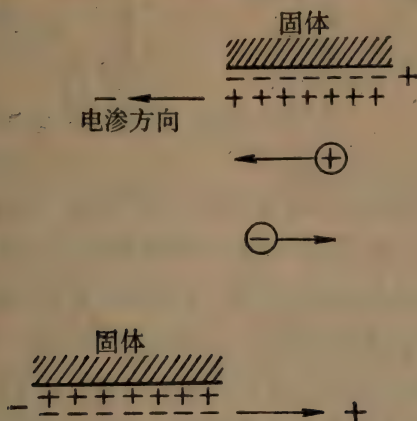


图 4-1 电渗示意图

的水溶液因为静电感应带有正电荷,在电场的作用下溶液便向负极移动并带着质点向负极移动。假如这时进行电泳,则质点移动的表面速度,是质点移动速度和由于溶液移动而产生的电渗速度的加和。若质点原来向负极移动,则其表面速度比电泳速度快。若质点原来向正极移动,则其表面速度比电泳速度慢。因此,在电泳时应尽量避免使用具有高电渗作用的支持物。

## 二、纸 电 泳

纸电泳是用滤纸作为支持物的电泳技术。它包括电泳槽和电泳仪两大部分。电泳槽是进行电泳的装置,其中包括电极、缓冲液槽、电泳介质的支架和一个透明的罩。常见的电泳槽有水平式(图



4-2)和悬架式(图 4-3)等。电泳仪是提供直流电源的装置,它能控制电压和电流的输出。纸电泳可分为低压电泳和高压电泳两

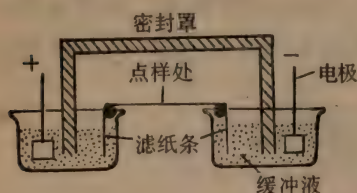


图 4-2 水平式电泳示意图

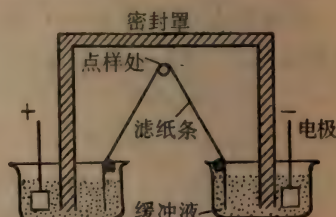


图 4-3 悬架式电泳示意图

类, 低压电泳仪的电压一般为 100—500 伏特, 电流为 0—150 毫安。高压电泳仪的电压为 500—10000 伏特, 电流为 50—400 毫安。电泳仪既能输出稳定的电压, 又能输出稳定的电流。

纸电泳的设备简单, 应用广泛, 是最早使用的一种电泳技术。在早期的生物化学研究中, 曾发挥重要作用。由于纸电泳时间长, 分辨率较差, 近年来逐渐为其他快速、简便、分辨率高的电泳技术所代替。

### 三、醋酸纤维薄膜电泳

采用醋酸纤维薄膜做为支持物的电泳方法, 叫做醋酸纤维薄膜电泳。醋酸纤维素是纤维素的羟基乙酰化所形成的纤维素醋酸酯。将它溶于有机溶剂(如丙酮、氯仿、氯乙烯、乙酸乙酯等)后, 涂抹成均匀的薄膜, 干燥后就成为醋酸纤维薄膜。现有国产醋酸纤维薄膜成品出售。醋酸纤维薄膜具有泡沫状的结构, 厚度约为 120 微米, 有很强的通透性, 对分子移动阻力很小。

醋酸纤维薄膜电泳是近年来推广的一种新技术。目前已广泛应用于科学实验, 生化产品分析和临床化验, 如血清蛋白、血红蛋白、球蛋白、脂蛋白、糖蛋白、甲胎蛋白、类固醇、同功酶等的分离和

鉴定。这种方法具有简单、快速、对样品要求量少、区带清晰、灵敏度高、便于照像和保存等特点。它的分辨力虽然比不上淀粉和聚丙烯酰胺凝胶电泳，但是比纸电泳要强得多。所以现在趋向用醋酸纤维薄膜电泳代替纸电泳（具体操作见本书实验五血清蛋白醋酸纤维薄膜电泳）。

#### 四、琼脂凝胶电泳

在凝胶电泳中，琼脂凝胶电泳是最早得到广泛应用的。因为它具有下列优点：①在琼脂凝胶中含有琼脂 1—1.5%，其余都是水。在这种凝胶中电泳，近似自由界面电泳，可是样品扩散又比自由界面电泳小。②琼脂凝胶电泳，支持物均匀，电泳区带整齐，分辨率高，重复性好。③液相与固相界面无明显界限，电泳速度快。④琼脂凝胶透明而不吸收紫外线，可以直接用紫外检测仪测定。⑤区带容易染色，样品容易洗脱，利于制备。⑥干膜可以长期保存。

除以上的优点外，琼脂凝胶电泳也有它的不足之处，因为琼脂是一种强酸性物质，能造成严重的电渗现象，影响电泳的速度，而且琼脂中所含可溶性杂质难于除去。

琼脂凝胶电泳有平板式和柱式两种，一般采用平板式为多。其实验步骤如下：

1. 配制缓冲溶液：琼脂凝胶电泳常用缓冲溶液的 pH 值多在 6—9 之间，离子强度为 0.02—0.05。离子强度过高时，由于大量电流通过琼脂板将产生热量，使板中水分大量蒸发而析出盐的结晶，甚至使琼脂板断裂，电流中断。常用的缓冲溶液，有硼酸盐缓冲液和巴比妥缓冲液。

2. 制板：制板常用的琼脂浓度为 1—1.5%。因为这个浓度制成的凝胶富有弹性，坚固不脆。将一定量的琼脂用水浴加热溶化，

趁热与等体积预热至  $60^{\circ}\text{C}$  的缓冲液混合, 使其浓度为  $1-1.5\%$ , 继续加热至表面无气泡, 迅速将凝胶倒在水平玻璃板上, 使其厚度约为 3 毫米, 冷却后即成琼脂板(注意这里所用缓冲液的离子强度必须比电泳时的离子强度高一倍)。

3. 点样: 加样方法有二: 一是挖槽法, 在琼脂板的中央挖一长方形小槽, 将在水浴上熔化至  $42-45^{\circ}\text{C}$  的琼脂与样品等量混合, 倒入小槽中, 也可直接将样品倒入小槽中。另一种是滤纸插入法, 在琼脂板上适当的位置用刀片切一裂缝, 插入蘸有样品的厚滤纸片, 纸片的宽度与琼脂板厚度一致。样品浓度一般以  $4-5\%$  为宜。

4. 电泳: 加样完毕后, 将琼脂板轻轻放在电泳槽上, 两端用几层滤纸与电极槽缓冲液连接。接通电源, 调节电压。一般电场强度为 6 伏特/厘米。

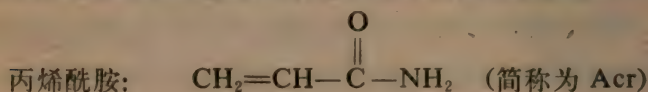
5. 固定和染色: 将电泳后的琼脂板浸入用  $70\%$  酒精配制的  $2\%$  醋酸溶液中  $15-20$  分钟进行固定。固定后的琼脂板, 需用自来水漂洗数次, 然后放在  $40^{\circ}\text{C}$  左右的烘箱中烘干, 这时琼脂板成一薄膜, 附于玻璃板上, 再以适当的显色剂显色。

## 五、聚丙烯酰胺凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶电泳是根据被分离物质所带的电荷多少及其分子大小、形状的不同, 在电场的作用下, 产生不同的移动速度而分离的方法。它具有电泳和分子筛的双重作用。

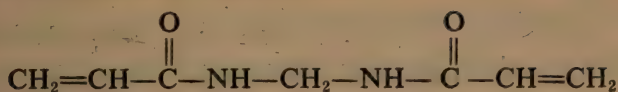
### (一) 聚丙烯酰胺的聚合

丙烯酰胺单体和交联剂  $\text{N}_1\text{N}'$ -甲叉双丙烯酰胺在催化剂的作用下聚合成含有酰胺基侧链的脂肪族长链。相邻的两个链通过甲叉桥交联起来就形成三维网状结构的聚丙烯酰胺凝胶。

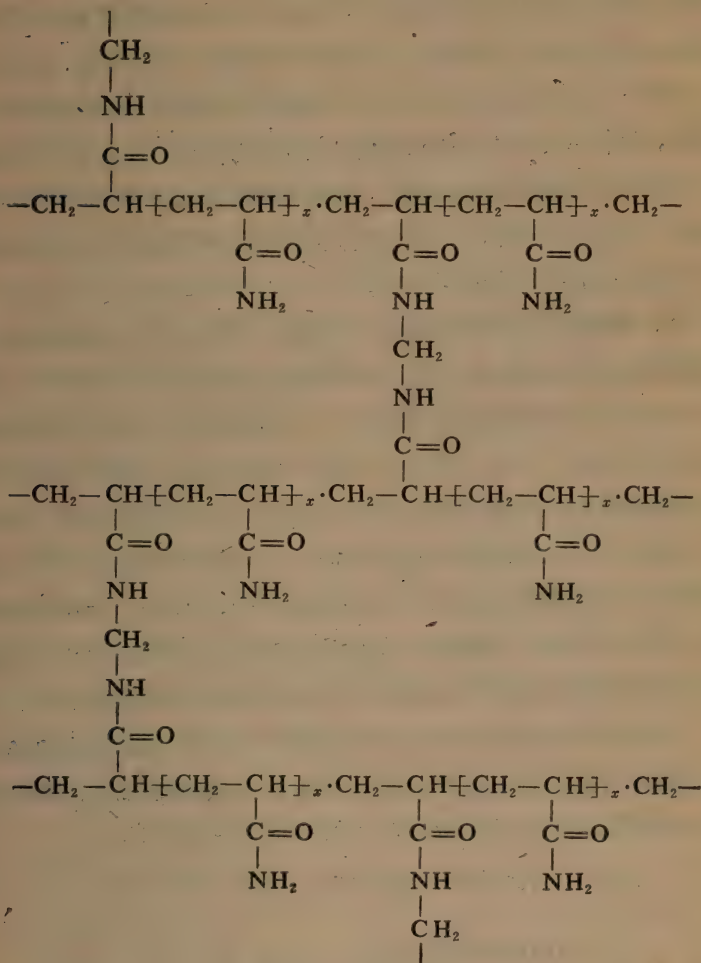




N,N'-甲叉双丙烯酰胺: (简称为 Bis)



聚丙烯酰胺



常用的催化剂(包括催化剂和加速剂)有以下两种:

1. 过硫酸铵-TEMED(四甲基乙二胺)系统: 当 Acr 和 Bis 的溶液中放入这个催化系统后, 过硫酸铵 $[(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8]$ 产生出游离氧原子使单体成为具有游离基的状态, 从而发生聚合作用。聚合的初速度和过硫酸铵浓度的平方根成正比。这种催化系统需要在碱性条件下进行, 例如, 在 pH8.8 条件下 7% 的丙烯酰胺溶液 30 分钟就能聚合完毕。在 pH4.3 时聚合很慢, 要 90 分钟才能完成。温度与聚合的快慢成正比。通常在室温下就很快聚合, 温度升高聚合更快。如将混合后的凝胶溶液放在近  $0^\circ\text{C}$  的地方, 就能延缓聚合。一般来讲温度过低, 有氧分子或不纯物质存在时都能延缓凝胶的聚合。为了防止溶液中气泡含有氧分子而妨碍聚合, 在聚合前须将溶液分别抽气, 然后再混合。

2. 核黄素-TEMED 系统: 这是一个光激发的催化反应。核黄素在光照下分解, 黄素被还原成无色型, 但在有氧条件下, 无色型又被氧化成有游离基的黄素环, 使聚合作用开始。核黄素催化系统的优点是: ①用量极少(1 毫克/100 毫升), 对所分析的样品没有任何影响。②聚合作用所需用的时间可以自由控制, 变化光照时间、强度, 可使聚合延缓或加速。而过硫酸铵-TEMED 系统的聚合作用所需的时间除了取决于温度、pH 值及有氧分子或不纯物质的存在外, 还取决于它们的浓度。为了使分析的结果重复性高, 核黄素催化系统的光照时间和强度最好标准化。

凝胶的机械强度和弹性是很重要的。凝胶的软硬、透明度、粘着度都会直接影响分离的效果。凝胶的机械性能、弹性、透明度和粘着度都取决于凝胶总浓度和 Acr 与 Bis 两者之比。

$$\text{设 } T (\text{Acr 和 Bis 总浓度}) = \frac{a+b}{m} \cdot 100(\%)$$

$$C (\text{交联剂百分比}) = \frac{b}{a+b} \cdot 100(\%)$$

式中:  $a$  = Acr 克数,  $b$  = Bis 克数  $m$  = 缓冲溶液体积(毫升),

其中  $a:b(w/w)$  是很关键的。当  $a:b < 10$  时, 凝胶变脆、变硬、呈乳白色;  $a:b > 100$  时, 5% 的凝胶呈糊状, 也易断裂。欲制备完全透明而又有弹性的凝胶应控制  $a:b = 30$  左右。不同浓度的单体对凝胶性质也有影响, 发现 Acr 低于 2%, Bis 在 0.5% 以下就不能聚合了。当增加 Acr 浓度时要适当降低 Bis 的浓度。通常  $T$  为 2—5% 时,  $a:b = 20$  左右;  $T$  为 5—10%,  $a:b = 40$  左右;  $T$  为 15—20% 时,  $a:b = 125—200$  左右。

用于研究大分子核酸的凝胶多为  $T = 2.4\%$  的大孔径凝胶, 因为太软不易操作, 最好加入 0.5% 琼脂糖。有的在 3% 凝胶中加入 20% 蔗糖也可增加其机械强度而不影响其孔径大小。至于粘着度, 一般说来只要容器内壁干净, 单体浓度适中, 凝胶与器壁粘着情况令人满意, 不会出现样品渗漏。新制备的凝胶与器壁附着力较大, 随存放时间的延长附着力降低, 有时在电泳结束时一部分胶柱就可能从管壁上滑脱出来。

## (二)、聚丙烯酰胺凝胶的孔径

聚丙烯酰胺凝胶在电泳中不仅有防止对流, 减低扩散的能力, 而且还具有分子筛的作用, 这是因为聚丙烯酰胺凝胶是一个三维空间网状结构。某一个分子通过这种网孔的能力显然取决于凝胶孔径的大小和形状, 也取决于被分离物质的大小和形状。因此, 当所分离的物质不变时, 凝胶越浓, 孔径越小, 所受阻力也就越大。

推算凝胶孔径的几种方法:

$$1. \quad \bar{p} = \frac{Kd}{\sqrt{c}}$$

式中:  $\bar{p}$  为孔径的平均直径;

$c$  为多聚体浓度;

$d$  为多聚体分子直径, 若不是卷曲的分子应为  $5\text{\AA}$ ;

$K$  为常数, 取决于凝胶的几何构型。假若多聚体的链是以近直角交联的, 则约为 1.5。

以 5 % 凝胶为例可计算出其孔径平均直径为  $38\text{\AA}$ 。这样的计算是粗略的, 与实际情况尚有一定的距离。

2. 有人计算 7.5 % 凝胶孔径的平均直径为  $50\text{\AA}$ , 30 % 的为  $20\text{\AA}$  左右。

3. 有人利用颗粒状聚丙烯酰胺凝胶做色层分析, 测定了总浓度 ( $T$ ) 为 6.5—20 % 的聚丙烯酰胺凝胶液在六种不同比例的双丙烯酰胺存在时聚合后的孔径大小, 结果见图 4-4。从图上可以看出, 孔径的大小在很大程度上取决于两者的总浓度 ( $T$ )。  $T$  值增大, 孔径相应变小, 机械强度增强。值得注意的是当  $T$  值不变时, Bis

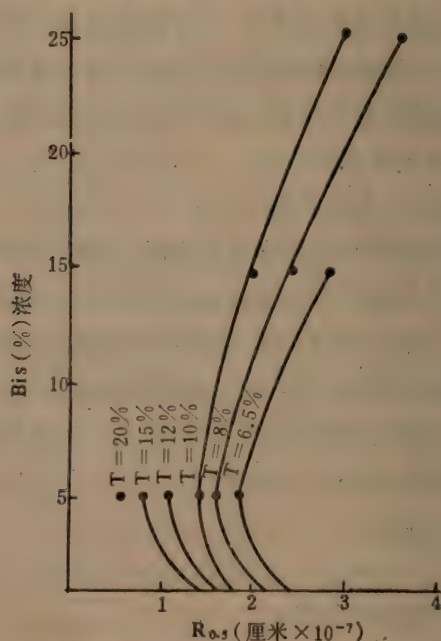


图 4-4  $R_{0.5}$  (凝胶体积中可利用的 50 % 分子的半径) 在聚丙烯酰胺总浓度 6.5—20 % 范围内与 Bis 百分率的关系。



浓度在5%时孔径最小, 高于或低于5% 孔径却相应变大。因此就可能有这样的现象出现; 当 Bis 浓度在5% 以上或以下时, 尽管  $T$  值很大, 但却比  $T$  值小而 Bis 为5%时的孔径要大。

分离蛋白质的实践证明, 胶的孔径大约是蛋白质分子平均大小的一半时分析结果较好。例如肌红蛋白和细胞色素分子的半径为2毫微米, 那么可选择平均胶孔半径为1毫微米的凝胶浓度(可参考图4-4)。因此, 在实用中常按样品的分子量大小来选择适宜的凝胶孔径。如表4-1。

表4-1 不同分子量范围所选用的凝胶浓度百分率

物 质	分 子 量 范 围	适用的凝胶浓度%
蛋 白 质	$<10^4$	20—30
	$1-4 \times 10^4$	50—20
	$4 \times 10^4 - 1 \times 10^5$	10—15
	$1-5 \times 10^5$	5—10
	$>5 \times 10^5$	2—5
核 酸 (RNA)	$<10^4$	15—20
	$10^4 - 10^5$	5—10
	$10^5 - 2 \times 10^6$	2—2.6

常用的所谓标准胶是指浓度为7.5%的凝胶, 大多数生物体内的蛋白质在此胶中电泳都能得到满意的结果。当分析一个未知样品时, 常常先用7.5%的标准凝胶或用4—10%的凝胶梯度来试测, 选出适宜的凝胶浓度。

### (三)、缓冲系统的选择

在选择缓冲系统时主要从以下两方面来考虑:

#### 1. pH 范围、离子种类和离子强度

对蛋白质来说, 选择的 pH 值应能使样品中各种蛋白质分子泳动率的差别最大。酸性蛋白质在高 pH 条件下, 碱性蛋白质在

低 pH 条件下常得到较好的分离效果。如果蛋白质样品经电泳分离后, 还希望测定其生物活性, 则缓冲系统的 pH 值不应过大或过小(大于 pH9 或小于 pH4), 否则会引起蛋白质活性的钝化。目前常用的分离胶缓冲系统有高 pH(pH9 左右), 低 pH(pH4 左右)和中性三大类。此外, 通常选用离子强度较低的缓冲溶液(0.01—0.1 摩尔/升)。因为离子强度低, 电导就低。电导低的优点是能产生高电压梯度, 电泳分离过程短, 产生的热量也较小, 分离效果好。

## 2. 连续和不连续系统

所谓连续系统是指电泳槽中缓冲系统和 pH 值与凝胶中的相同, 不连续系统是槽中与凝胶中的缓冲系统和 pH 值不同。不连续系统的分辨率较高。

### (四) 不连续盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳

不连续盘状电泳往往包含两种以上的缓冲溶液, pH 值和凝胶孔径。多用于分析浓度较稀的样品。一般是在内径为 0.7 厘米, 长 10 厘米的小玻璃管内, 把三种性质不完全一样的聚丙烯酰胺凝胶重叠起来, 如图 4-5 所示, 图中

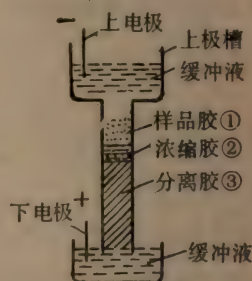


图 4-5 不连续凝胶电泳示意图

①为样品胶(其中含有样品), ②为浓缩胶(又名成层胶), 这两种胶的缓冲液, pH 值和孔径大小完全一样。③是分离胶(又叫电泳胶), 其孔径一般比浓缩胶小, pH 值也不同。样品胶和浓缩胶是  $T=3\%$ ,  $C=20\%$  的单体溶液在 Tris-HCl 缓冲液中由核黄素催化合成的大孔胶, pH6.7。而分离胶是由  $T=7\%$ ,  $C=2.5\%$  的单体溶液在 Tris-HCl 缓冲液(pH8.9)中通过过硫酸铵催化聚合而成的小孔胶。将含有这三种凝胶的玻璃管放在含有 Tris-甘氨酸(pH8.3)缓冲液的电泳槽内进行电泳, 就

是不连续的盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳。它之所以有很高的分辨力是因为有三种效应：即浓缩效应，电荷效应和分子筛效应。

浓缩效应：样品通过浓缩胶被浓缩成高浓度的样品薄层，甚至有的能浓缩几百倍。为什么样品会在浓缩胶中被压挤成层呢？这是因为样品胶和浓缩胶是用 pH6.7 的 Tris-HCl 缓冲液制成；电泳时，由于 HCl 解离度大，几乎全部释放出  $\text{Cl}^-$ ；而在电泳槽中的 Tris-甘氨酸缓冲液是 pH8.3，因为甘氨酸等电点为 6.0，在电泳过程中，它只有极少数分子 (1—0.1%) 解离成  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ 。一般酸性蛋白质在此 pH 值下也解离为带负电荷的离子，但其解离度比 HCl 小，比甘氨酸大。这三种离子带有同性电荷，在一定的电场作用下，它们的泳动率是不一样的。而且它们的有效泳动率是按下列次序排列的。即： $m_{\text{Cl}}\alpha_{\text{Cl}} > m_{\text{蛋}}\alpha_{\text{蛋}} > m_{\text{甘}}\alpha_{\text{甘}}$

$m$  为泳动率， $\alpha$  为解离度， $m\alpha$  为有效泳动率。

根据有效泳动率的大小，最大的称为快离子（或先行离子，这里是  $\text{Cl}^-$ ），最小的称为慢离子（或随后离子，这里是  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ ）。电泳开始时三种凝胶中都含有快离子，只有电泳槽中的缓冲液含有慢离子。电泳开始后，由于快离子的泳动率最大在快离子后边就形成一个离子浓度低的区域，即低电导区。电导与电压梯度是成反比的：

$$E = \frac{I}{\eta} \left[ \frac{\text{伏}}{\text{厘米}} \right]$$

$E$ ：电压梯度  $I$ ：电流密度  $\eta$ ：电导率

所以低电导区就产生了较高的电压梯度。这种高电压梯度使蛋白质和慢离子在快离子后面加速移动。因而在高电压梯度区和低电压梯度区之间形成一个迅速移动的界面。（如图 4-6）。由于样品中蛋白质的有效泳动率恰好介于快、慢离子之间，所以也就聚集在这个移动的界面附近，被浓缩成一狭小的样品薄层。



电荷效应：蛋白质混合物在界面处被高度浓缩，堆积成层，形成一狭小的、高浓度的蛋白质区带，但由于每种蛋白质分子所带的电荷不同，因而泳动率不同，各种蛋白质就以一定的顺序排列成一个一个的圆盘状蛋白质区带。

分子筛效应：当蛋白质通过浓缩胶进入分离胶时，由于 pH 值和凝胶孔径突然改变，（选择分离胶的 pH 为 8.9，电泳时经实际测

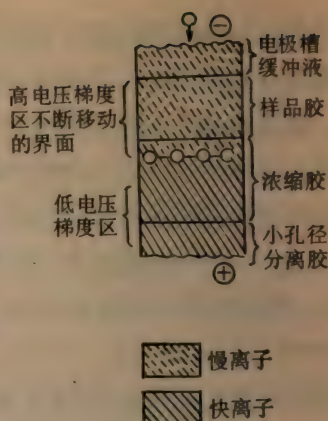


图 4-6 不连续电泳浓缩效应示意图

量为 pH9.5)，使甘氨酸的解离度增大，因而它的有效泳动率也增加，此时甘氨酸很快就赶上并超过了蛋白质分子，这样高电压梯度不存在了，使蛋白质样品进入一个均一的电压梯度和 pH 条件的分离胶中。分离胶的孔径较小，分子量或构型不同的蛋白质通过分离胶，所受摩擦力不同，受阻滞的程度不同，因此表现出不同的泳动率，即所谓的分子筛作用。即使净电荷相似，泳动率相等的蛋白质分子，也会由于分子筛效应在分离胶中被分开。（具体操作请参阅本书第三篇）。

聚丙烯酰胺凝胶电泳除具有分子筛作用以外，还具有下面一些优点：

1 聚丙烯酰胺凝胶是人工合成的凝胶，可以通过调节控制单体浓度或单体和交联剂的比例，形成不同程度的交联结构。很容易得到孔径大小、范围广泛的凝胶，所以实验重复性很高。

2. 聚丙烯酰胺形成的凝胶，机械强度好，弹性大，便于电泳后的一切处理。

3. 聚丙烯酰胺凝胶是碳-碳的多聚体，只带有不活泼的酰胺



基侧链,没有其他离子基团,因而几乎没有电渗作用。并且不与样品相互作用。

4. 在一定范围内,聚丙烯酰胺对热是稳定的,凝胶无色透明,易于观察,可用检测仪直接测定。

5. 设备简单,所需样品量小(1—100 微克),而分辨率高。在超微量分析中,能检出含量在  $10^{-9}$ — $10^{-12}$  克的样品。

6. 用途广泛,对生物高分子化合物(如蛋白质、酶、多肽、核酸)能进行分离鉴定。又可用于毫克水平的制备。

目前广泛应用于分子生物学、生物化学、细胞学、微生物学、植物学、动物学、免疫学、酶学等学科的研究以及临床化验。

## 第五章 分光光度法

分光光度法是利用物质所特有的吸收光谱来鉴别物质或测定其含量的技术。因为分光光度法极为灵敏、精确、快速和简便；在复杂组分的系统中，不需要分离，即能检测出其中所含的极少量物质，因此分光光度法目前已成为生物化学研究中广泛使用的方法之一。

### 一、原 理

如果用加热、放电、射线照射等方法来激发物质，可使物质发光。物质所发射的光是具有电磁本质的物质，它既有波动性，又有微粒性。

光波和其它波一样，具有一定的频率( $\nu$ )。不同单色光的颜色不同，就是因为其频率不同。但不同频率的光在真空中的传播速度( $c$ )相同，都是  $3 \times 10^8$  米/秒。根据光的速度( $c$ )和频率( $\nu$ )可计算出它的波长( $\lambda$ )。

$$\lambda = \frac{c}{\nu}$$

人眼可见的光只占电磁波谱的很小一部分(400—760nm)。它是一种频率较大的电磁波。

电磁波按频率大小，从频率最小的无线电波到频率最大的  $\gamma$ -射线，排成一行，即组成电磁波的波谱，如图 5-1 所示。

我们所讨论的光谱范围，包括波长范围为 400—760nm 的可见光区和波长范围为 200—400nm 的紫外光区。

钨灯光源所发的光通过三棱镜折射后，在另一侧面的屏上可

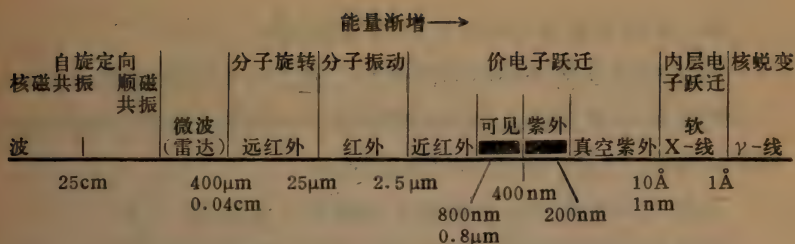


图 5-1 电磁波谱的图解

得到由红、橙、黄、绿、蓝、靛、紫组成的连续色谱。这个色谱就是钨灯的发射光谱。各种不同的光源都有其特有的发射光谱。因此可采用不同的发光体作为仪器的光源。如钨灯能发出 400—760nm 波长的光谱,可作为可见光分光光度计的光源。氢灯能发出 185—400nm 波长的光谱,可作为紫外分光光度计的光源。

如果在光源和棱镜之间放上某种物质的溶液,此时在屏上所显示的光谱已不再是光源的光谱,它出现了几条暗线。即光源发射光谱中某些波长的光因溶液吸收而消失。这种被溶液吸收后的光谱称为该溶液的吸收光谱。不同物质的吸收光谱是不同的。因此根据吸收光谱,可以鉴别溶液中所含的物质。

分子中的每一个电子往往处于基态,但在一定条件下,它们可以获得能量,上升为激发态。为了使它们从基态跃迁到激发态,必须吸收一个恰好等于跃迁所需能量的量子来增加电子的能量。所以当光线穿过这一物质时,某些量子化的能即传递给这物质,使它的电子提升到较高的能级状态。同样,当激发态的电子回到基态时,它发射出特征波长的辐射。能量与频率的关系式如下:

$$E = E_1 - E_2 = h\nu$$

$E$  = 分子吸收或发射的辐射能

$E_1$  = 电子在起始能级的能量

$E_2$  = 电子在最终能级的能量

$h = \text{普朗克常数} = 6.63 \times 10^{-27} \text{ 尔格} \cdot \text{秒}$

当光线通过某种物质的溶液时，透过的光的强度减弱。因为有一部分光在溶液的表面反射或分散，一部分光被组成此溶液的物质所吸收，只有一部分光可透过溶液。

入射光 = 反射光 + 分散光 + 吸收光 + 透过光

如果我们用蒸馏水(或组成此溶液的溶剂)作为“空白”去校正反射，分散等因素造成的入射光的损失，则

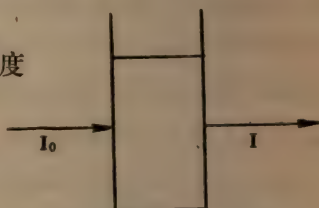
入射光 = 吸收光 + 透过光

$I_0$  = 经过空白校正后入射光的强度

$I$  = 透过光的强度

根据实验得知

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon cl}$$



式中， $c$  表示吸收物质的摩尔浓度。 $l$  表示吸收物质的光径，用厘米表示。 $\epsilon$  表示吸收物质的摩尔消光系数。它表示物质对光的吸收特性，不同物质的  $\epsilon$  数值不同。

所以

$$\frac{I}{I_0} = 10^{-\epsilon cl}$$

$$\text{令 } T (\text{透光率}) = \frac{I}{I_0}$$

$$\therefore T = 10^{-\epsilon cl}$$

若以  $T$  对吸收物质的浓度作图，则得图 5-2 中的图形。由上式可得

$$\lg \frac{1}{T} = \epsilon cl$$

$\lg \frac{1}{T}$  称为物质的消光值 ( $E$ ) 或吸收值 ( $A$ )

$$\therefore E = \epsilon cl$$

若以  $E$  对物质的浓度作图，则得图 5-3 中的直线。



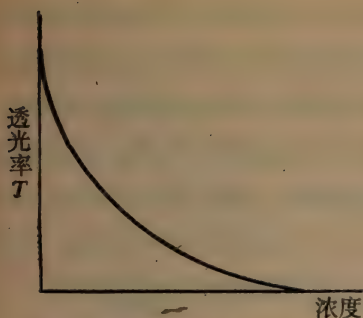


图 5-2 透光率与物质浓度的关系

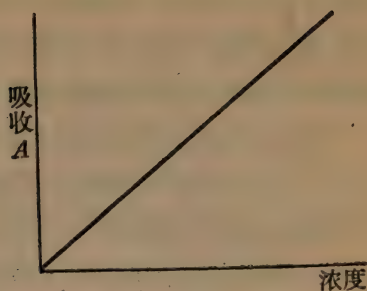


图 5-3 吸收与物质浓度的关系

上式说明了物质的光吸收与吸收物质的浓度和液层的厚度成正比。这就是 Beer-Lambert 定律。

## 二、分光光度计的基本部件

分光光度计根据使用的波长范围不同可分为紫外光区、可见光区和红外光区分光光度计。无论哪一类分光光度计都包括五个基本部件：光源、单色器、吸收池、检测器和测量仪表。分光光度计各部件的次序如下图所示：

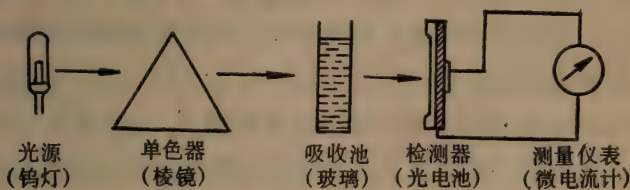


图 5-4 分光光度计基本结构示意图

### (一) 光源

分光光度计上常用的光源有两种，钨丝灯或氢灯

在可见光区、近紫外光区和近红外光区常用钨丝灯作为光源，其工作温度约为  $2870^{\circ}\text{K}$ 。钨丝灯的灯丝为紧密螺旋形，若将灯丝

对准仪器光学装置的轴线时，能在出光狭缝的平面上投射光亮均匀的直线影象。钨丝灯的缺点是在短波长( $<350\text{nm}$ )处辐射强度小，而且必须小心地控制流至灯上的电流才能维持恒定的强度。

在紫外光区多使用氢弧灯。氢灯内充有低压氢气，在两极间施以一定电压来激发氢分子可发出紫外光。因玻璃吸收紫外线(光学玻璃的透射范围为 $340\text{—}1000\text{nm}$ )，所以氢灯的泡壳用石英制成(石英的透射范围为 $185\text{—}3500\text{nm}$ )，或在灯泡的发光处开一石英窗。

若用氘灯代替氢灯，虽发射的波长范围相同，但在紫外光区的发射强度可增加三倍之多。因氘灯价格昂贵，一般很少使用。

## (二) 单色器

单色器是把混合光波分解为单一波长光的装置。在分光光度计中多用棱镜或光栅作为色散元件。

### 1. 棱镜

光波通过棱镜时，不同波长的光折射率不同。波长愈短，传播速度愈慢，折射率也愈大；反之，波长愈长，传播速度愈快，折射率则愈小。因而能将不同波长的光分开。因为玻璃对紫外线的吸收力强，故玻璃棱镜多用于可见光分光光度计。石英和熔融石英(fused silica)棱镜可在整个紫外光区传播光，故在紫外光分光光度计中广为应用。熔融石英虽比石英在短波长方面更易传播光，但因价格昂贵，仅在需要高强度辐射时，才被使用。

### 2. 衍射光栅

在石英或玻璃的表面上刻划许多平行线(每英寸约刻 $15,000\text{—}30,000$ 条)。由于刻线处不透光，通过光的干涉和衍射使较长的光波偏折角度大，较短的光波偏折角度小，因而形成光谱。

在光源照到棱镜(或光栅)以前，一般先要经过一个入射狭缝，

再通过平行光镜使成为平行光束投到棱镜上。透过棱镜的光再经另一聚光镜，在此聚光镜的焦面内可得一清楚的光谱图。如在焦点处放一出射狭缝，转动棱镜使光谱移动，就可以从出射狭缝射出所需要的单色光。整个装置称为“单色器”。

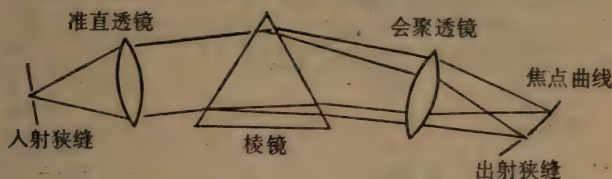


图 5-5 棱镜单色器

### (三) 吸收池(比色杯、比色皿、比色池)

一般由玻璃、石英和熔凝石英制成，用来盛被测的溶液。在低于 350nm 的紫外光区工作时，必须采用石英池或熔凝石英池。

当光透过吸收池时，有一部分光因空气和玻璃接触面的反射而损失，其数值约为 4%。为了减少这种反射损失，吸收池必须与光束方向垂直。此外在制造吸收池时，也应尽可能使每套池子完全相同(如玻璃的质料、厚度等)，以免产生误差。

吸收池上的指纹、油污或壁上一些沉积物都会显著地影响其透光性，因此在使用前务必彻底清洗。

### (四) 检测器

常用的检测器有三种：光电池、光电管和光电倍增管。

#### 1. 光电池

光电池是由三层物质组成的圆形或长方形薄片，装在一个特制的匣子里面。第一层是一种导电性良好的金属(如银)，这是光电池的负极。中间极薄的一层是半导体硒，第三层是铁，这是光电池的正极。当光电池受光照射以后，半导体硒的表面逸出电子，这些电子只向负极方向移动，而不向正极移动，因此在上下两金属

片间产生一个电位差,线路连通时即产生电流(图 5-6)。

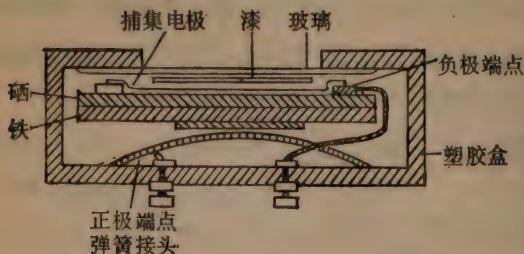


图 5-6 光电池

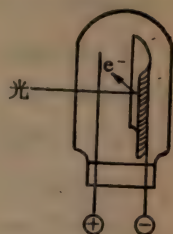


图 5-7 光电管

## 2. 光电管

光电管是由封装在真空透明封套里的一个半圆柱型阴极和一个丝阳极组成。阴极的凹面上有一层光电发射材料,此种物质经光照射可发射电子。当在两极间加有电位时,发射出来的电子就流向丝阳极而产生光电流。对于相同的辐射强度,它所产生的电流约为光电池所产生电流的  $1/4$ 。由于光电管具有很高的电阻,所以产生的电流容易放大。

## 3. 光电倍增管

光电倍增管远比普通的光电管优越,它可将第一次发射出的电子数目放大到数百万倍。图 5-8 为光电倍增管的示意图。

和光电管相似,光电倍增管的阴极表面在光的照射下可发射

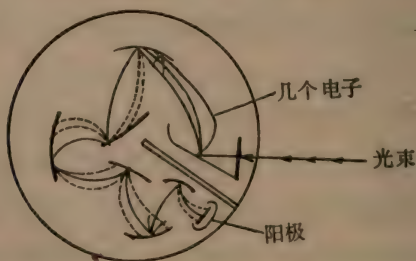


图 5-8 光电倍增管



电子。电子被带有正电的兼性阳极(dynode)所吸引,并向着它加速运动。当电子打在兼性阳极上时,能引起更多的电子自表面射出。这些射出的电子又被第二个兼性阳极所吸引,同样再产生更多的电子。这样的过程重复9次后,每个光子可形成 $10^6-10^7$ 个电子。这些电子最后被收集在阳极上。所得到的倍增电流可进一步加以放大和测量。

### (五) 测量装置

一般常用的紫外光和可见光分光光度计有三种测量装置,即电流表、记录器和数字示值读数单元。现代的仪器常附有自动记录器,可自动描出吸收曲线。

## 三、几种国产分光光度计的介绍

### (一) 72 型分光光度计

本仪器是上海分析仪器厂生产的一种可见光分光光度计,波长范围为420—700nm。它由稳压器、单色光器和微电计三部分所组成。其光学系统如图5-9所示:

仪器的光源是一个10V,7.5A的钨丝灯泡,由一个磁饱和稳压器向它提供低压电源。钨丝灯发出的光经过进光狭缝,反射镜和透镜后,成为平行光进入棱镜,色散后的各种波长的单色光被镀铝反射镜反射,经过另一块透镜,再聚光于出光狭缝上。在出光狭缝的后部为比色皿定位装置。单色光通过盛有被测溶液的比色皿后;再射到硒光电池上。根据比耳定律,溶液的浓度愈大或液层愈厚,则透过光线的强度愈低。根据透过溶液后的光线强度,在半导体硒光电池上产生相应的光电流,因而在微电计的标尺上,可读出相应的吸收值或透光度的读数。

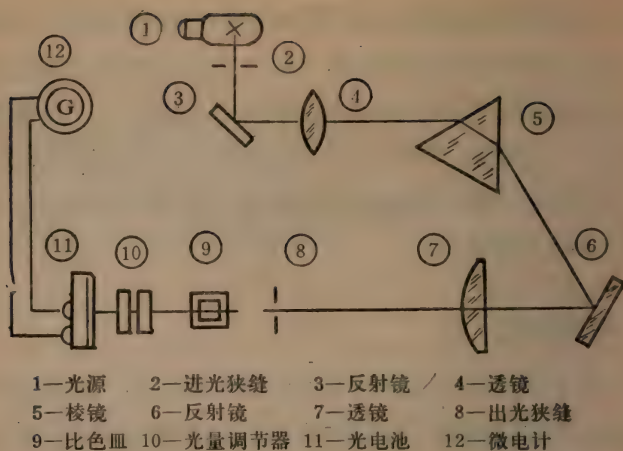


图 5-9 72 型分光光度计的光学系统

## (二) 721型分光光度计

721 型分光光度计为上海第三分析仪器厂产品。采用自准式光路,单光束方法。其波长范围为 360—800nm,用钨丝白炽灯泡

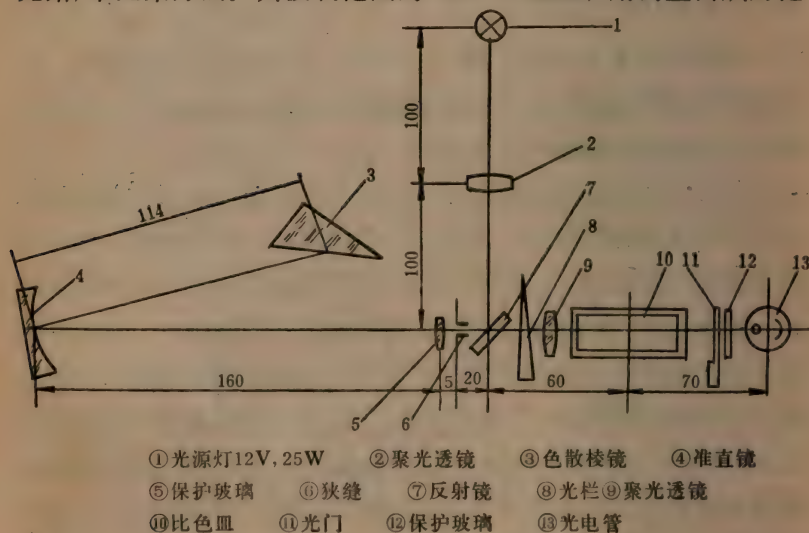


图 5-10 721 型分光光度计的光学系统

为光源。其光学系统如上简图所示：

由灯泡发出的连续辐射光线，经过聚光透镜会聚后，再经过平面镜转  $90^\circ$  角。光线反射后，经入射狭缝而入射到单色器内。狭缝正好位于球面准直物镜的焦面上。当入射光线经过准直镜反射后，就以一束平行光射向棱镜（该棱镜背面镀铝），并在其中色散。入射角在最小偏向角，入射光在铝面上依原路反射回来，再经过准直物镜反射，而会聚在出光狭缝上。由狭缝出来的光通过被测的溶液，再射到 GD-7 型光电管上。GD-7 型光电管的铈、铯、钾、钠阴极面对整个可见光区都较灵敏（光谱灵敏范围  $350-850\text{nm}$ ）。光电管受光后所产生的光电流，经过一组高值电阻（ $50\text{M}$ 、 $500\text{M}$ 、 $1\text{KM}\Omega$ ），在电阻两端形成一个电压降，通过电压降的测定来间接地测量光电流的变化。

### （三）751G 型分光光度计

751G 型分光光度计是上海分析仪器厂制造的一种紫外分光光度计。它能测定物质在紫外光区、可见光区和近红外光区的吸收光谱、波长范围为  $200-1000\text{nm}$ 。

本仪器是根据相对测量的原理而设计的。测定时先选定某一溶剂（或空气）作为标准，并认为它的透光率为  $100\%$ 。而被测样

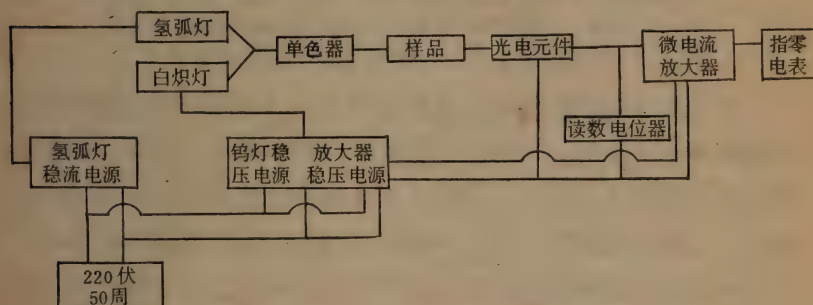


图 5-11 751 型分光光度计结构简图

品的透光率是相对于标准而言。也就是说，被测样品在一定波长下的透光度就是由出射狭缝射出的单色光分别通过被测样品和标准溶液，这两个能量的比值。

仪器的方块图如上：

751G 型分光光度计采用单光束自准式光路，其波长范围为 200—1000nm。在波长 320—1000nm 范围内，用钨丝白炽灯泡，在波长 200—320nm 范围内，用氢弧灯作为光源。其光学系统如下立体图所示：

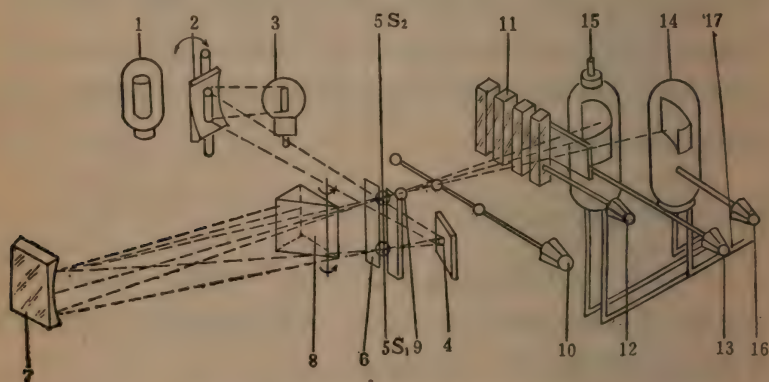


图 5-12 751 分光光度计光学系统立体图

- ①氢弧灯 ②凹面反光镜 ③钨丝灯 ④平面反光镜 ⑤石英窗  
⑥弯曲狭缝 ⑦准直镜 ⑧石英棱镜 ⑨石英透镜 ⑩滤光片架  
⑪比色皿 ⑫比色皿托架拉杆 ⑬暗电流控制闸门 ⑭紫敏光电管  
⑮红敏光电管 ⑯光电管滑动架 ⑰到放大器

由光源①(或③)发出的连续辐射光线，射到聚光凹面镜②上，再被反射到平面镜④，然后再反射至入射狭缝  $S_1$ ，它正好位于球面准直物镜⑦的焦面上。因此入射光线到达物镜⑦并经反射后，就以一束平行光射向棱镜⑧(该棱镜背面镀铝)。光线以最小偏向角射入棱镜，为棱镜底面所反射，重又穿过棱镜。经过棱镜的色散作用，分开光谱带。从棱镜色散后出来的光线经准直物镜⑦反射



后,会聚在出射狭缝  $S_2$  上。出射狭缝和入射狭缝是共轭的,因此入射狭缝与出射狭缝安置在同一狭缝机构上,同时开闭。为了消除杂散光对于测量结果的影响,在出射狭缝后装有滤光片⑩ 365nm 及 580nm 各一块。此外还有一装滤光片的孔,可根据需要放入其它滤光片(也可不放任何滤光片)。光线通过滤光片后,进入样品室。在比色皿托架上可放四支比色皿⑪。根据波段需要可以采用玻璃或石英的比色皿。为了使光线能够集中地照射到光电管阴极上,在出射狭缝后装有石英聚光镜⑨。

本仪器采用真空光电管紫敏 GD-5 和红敏 GD-6 作为接收元件,用以将光能转换为电能。其中 GD-5 为铯铯阴极面,对紫光灵敏,使用波长为 200-625nm。GD-6 为银氧铯阴极面,对红光灵敏,使用波长为 625-1000nm。

透过被测样品的光线照到光电管上,发生光电效应产生光电流,再流过一个高值电阻(2KM $\Omega$ ),在电阻两端形成电压降。本仪器就是通过测定电压降来间接地测定所产生的光电流。

## 第六章 放射性同位素技术

放射性同位素技术利用同位素和普通原子在化学性质上的相似(因而生物体不能区别它们)来研究物质的代谢变化;又利用它们在物理性质上的不同,使用探测仪器测量和追踪。这种技术解决了很多以前无法解决的问题,是一种非常有效的研究工具,在生物化学应用中有重要价值。

### 一、基本知识

#### (一) 同位素

原子由一个带正电荷的核和围绕着核的带负电荷的电子云组成。原子的质量集中在核上。原子核含质子和中子两种主要成分。质子是带正电荷的粒子,其质量大约是电子的 1850 倍。原子不带电,其核中的质子数等于轨道中的电子数。这个数叫做原子序数(Z)。中子是不带电的粒子,其质量大约等于一个质子。原子核中质子数和中子数的总和叫做质量数(A)。

$$\text{即: } A = Z + N; \quad N = \text{中子数}.$$

由于中子数与原子序数无关,所以它不影响原子的化学性质。一种元素的原子不一定含有相同的中子数。原子序数(质子数)相同而质量数不同的元素叫做同位素。

同位素的表示方法一般是将原子序数标记在元素符号的左下方,质量数标记在它的左上方,如:  ${}^{12}_6\text{C}$  和  ${}^{14}_6\text{C}$ ,  ${}^{16}_8\text{O}$  和  ${}^{18}_8\text{O}$ 。

每一种元素的同位素数目是不同的。最先发现的是氮的同位

素,即 $^{20}_{10}\text{Ne}$ 、 $^{21}_{10}\text{Ne}$ 和 $^{22}_{10}\text{Ne}$ 。

同位素可分为稳定性同位素和不稳定性同位素两类。原子核结构稳定,不会自发衰变的同位素叫做稳定性同位素。不稳定性同位素又称放射性同位素,其不稳定的原子核会自发衰变,以一种固有的速度放出 $\alpha$ -射线( $\alpha$ -衰变)或 $\beta$ -射线( $\beta$ -衰变),或 $\gamma$ -射线( $\gamma$ -衰变)原子核本身也转变为稳定性元素。以氢元素为例,氢有三种同位素 $^1\text{H}$ 、 $^2\text{H}$ 、 $^3\text{H}$ ,前两种是稳定性同位素, $^3\text{H}$ (氚)是放射性同位素。氚能自发衰变,产生 $\beta$ -射线,变为 $^3\text{He}$ (氦)。放射性同位素主要是由人工生产的。

稳定性同位素在使用上不如放射性同位素方便,它的灵敏度不如放射性同位素高,而且探测也困难得多。本章简略介绍有关放射性同位素的知识。

## (二) 射线的性质

### 1. $\alpha$ -射线的性质:

原子核发生 $\alpha$ -衰变时失去两个质子和两个中子同时放出 $\alpha$ 粒子,即新形成的核和原来相比,质量减少4,原子序数减少2。可见, $\alpha$ -粒子实际上是两个质子和两个中子组成的氦原子核。它们从核中以每秒 $2 \times 10^4$ 公里的速度放射出来,其能量一般是几个兆电子伏特(一个电子伏特是一个电子在1伏特的电位差中加速通过时所获得的能量,等于 $1.6 \times 10^{-19}$ 焦耳)。由于 $\alpha$ -粒子在很短的路程上就能把大量的能量用于电离,所以当进入生物体中时,对生物有较大的损害。然而, $\alpha$ -射线对生物的外照射效应非常小,用一层纸就能挡住 $\alpha$ 粒子。

在生物化学实验工作中不常遇到 $\alpha$ -衰变的同位素。

### 2. $\beta$ -射线的性质:

原子核发生 $\beta$ -衰变时,一个中子通过发射一个带负电荷的 $\beta$ 粒子而转变为一个质子。结果核失去了一个中子得到一个质子,其



原子序数增加 1, 质量数保持不变。如在生物化学中常使用的  $^{14}\text{C}$  的  $\beta$ -衰变可表示为  $^{14}_6\text{C} \rightarrow ^{14}_7\text{N} + \beta^-$ 。 $\beta$ -射线是电子流、速度为每秒  $2 \times 10^5$  公里, 接近于光速。 $\beta$ -射线的电离作用比  $\alpha$  粒子小, 但它的穿透能力却比  $\alpha$ -射线大许多倍。

各种放射性元素所放出的  $\beta$  粒子的能量不同, 能量最小的是氚 ( $^3\text{H}$ ) 的  $\beta$  粒子, 它的能量是 0.018 兆电子伏特。 $^{32}_{15}\text{P}$  的放射性较强。它的  $\beta$  粒子的能量是 1.71 兆电子伏特。

$^3\text{H}$  的  $\beta$ -射线在空气中的射程不到 0.5 厘米, 在组织中的射程更小, 只有 6 微米。一般来讲  $\beta$ -射线可以用 1 厘米厚的有机玻璃屏挡住, 所以  $\beta$ -射线的外照射问题不太大。但是, 在任何情况下都不能忽视这种防护, 因为  $\beta$ -射线有可能在机体的表面上被完全吸收而引起很大的破坏作用。

### 3. $\gamma$ -射线的性质.

$\gamma$ -射线是一种光子流, 以光速 (在真空中每秒  $3 \times 10^5$  公里) 运动, 其能量大约在几十万电子伏特以上。光子不带电荷所以  $\gamma$ -射线不能直接使遇到的物质电离。 $\gamma$ -衰变本身并不引起原子序数或质量的变化。但它经常同时伴随着  $\alpha$  或  $\beta$  粒子的发射。

$\gamma$ -射线的波长非常小, 而振动频率很大, 穿透力又强, 所以要用密度较大的物质 (如铅) 来进行防护。

## (三) 放射性衰变的规律

原子核的放射性衰变以放射性元素所特有的固定速度进行, 始终遵循着一个规律, 不受外界条件的影响; 即单位时间内衰变的原子数与现存的放射性原子数  $N_0$  成比例。假如某一种放射性原子现在有  $N_0$  个, 那么经过时间  $t$  后, 它就剩下  $N$  个原子,  $N$  和  $N_0$  的关系如下式:

$$N = N_0 e^{-\frac{0.693}{T_{1/2}} \cdot t}$$



式中:  $t$  的时间单位与  $T_{1/2}$  的时间单位一致。

$e$  是自然常数, 为 2.718。

$T_{1/2}$  是半衰期。

半衰期是放射性元素的原子核因衰变而减少到原来的一半所需要的时间。它对于一定的放射性元素是个常数(表 6-1)。

如:  $^{60}\text{Co}$  放射源出厂时的放射性强度为 10,000 居里, 则半年后剩下的放射性强度应按以下的方法计算。

已知  $N_0 = 10,000$  居里,  $t = 0.5$  年,  $T_{1/2} = 5.26$  年代入公式后

$$\begin{aligned} N &= 10000e^{-(0.693/5.26) \times 0.5} \\ &= 10000e^{-0.0659} \\ &= 10000 \times 0.9363 = 9363 (\text{居里}) \end{aligned}$$

表 6-1 给出了在生物化学实验工作中常用的一些同位素的半衰期。

表 6-1 生物化学研究中使用的一些同位素

同 位 素	射 线	半 衰 期
$^3\text{H}$	$\beta^-$	12.26年
$^{14}\text{C}$	$\beta^-$	5730年
$^{32}\text{P}$	$\beta^-, \gamma$	14.30天
$^{35}\text{S}$	$\beta^-$	87.90天
$^{42}\text{K}$	$\beta^-, \gamma$	12.40小时
$^{60}\text{Co}$	$\beta^-, \gamma$	5.26年
$^{45}\text{Ca}$	$\beta^-$	165天
$^{59}\text{Fe}$	$\beta^-, \gamma$	45天
$^{131}\text{I}$	$\beta^-, \gamma$	8.05天

氮和氧的放射性同位素的半衰期太短 ( $^{15}\text{O}$  的半衰期是 2.03 分,  $^{13}\text{N}$  的半衰期是 10.00 分), 在研究工作中不便使用, 故未列在表中。通常使用这两种元素的稳定性同位素  $^{15}_7\text{N}$  和  $^{18}_8\text{O}$ 。

#### (四) 放射性强度的单位:

放射性强度的基本单位是居里。每秒放射  $3.7 \times 10^{10}$  粒子的任何同位素的量为 1 居里。在生物学中, 通常使用毫居里、微居里、毫微居里这些更小的单位。必须注意, 居里指的是样品中真正发生的衰变数 (即衰变/秒), 而不是用探测器所探测到的衰变数 (即计数/秒)。在实际应用中后者也可当做放射性强度的单位。

1 居里(c) ——  $3.7 \times 10^{10}$  次核衰变/秒

1 毫居里(mc) ——  $3.7 \times 10^7$  次核衰变/秒

1 微居里( $\mu$ c) ——  $3.7 \times 10^4$  次核衰变/秒

1 毫微居里(nc) ——  $3.7 \times 10$  次核衰变/秒

使用任何一种放射性探测仪必须从衰变数中减去“本底”。“本底”是宇宙线、仪器本身放射性(如污染)和电子线路噪声等所造成衰变数的总和。

在进行具有放射性同位素的实验中常加入该种元素的稳定性同位素作为载体。故应使用放射性比强度来表示放射性强度。放射性比强度通常指单位质量(克)或体积(毫升)内的放射性衰变数(或计数)。

$$\text{比放射性} = \frac{\text{单位时间内的衰变数(或计数)}}{\text{样品的重量(或体积)}}$$

## 二、射线的探测

射线通过物质时与物质发生相互作用而产生一些特殊的效应(如电离), 探测射线产生这些特殊效应的能力的仪器叫做射线探测器。射线探测器的种类很多, 在生物学研究中常用的有如下两种:

## (一) 盖革计数器

盖革计数器适用于测量 $^{32}\text{P}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{36}\text{Cl}$ 等高能 $\beta$ 粒子的放射性强度。

盖革计数器包括三个部分：盖革管、高压电路及机械记录器。常见的盖革计数管有圆柱形计数管及钟罩形计数管两种，它们的结构基本相同。即在密闭外壳内安置两个电极；中央的细钨丝为阳极，管内壁的金属圆筒为阴极。抽去管内空气后放进一些惰性气体（氩、氖、氦等）和少量猝灭气体（乙醇、甲烷等）。

用盖革管探测射线的基本原理如图 6-1

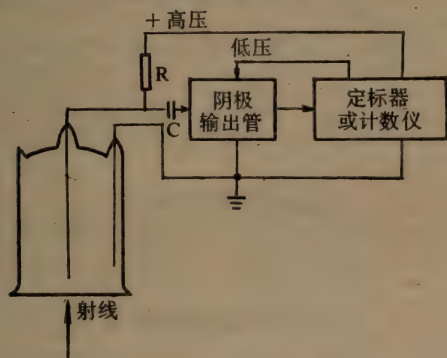


图 6-1 G-M 管探测器方块图

当射线进入管内冲击惰性气体并使之电离时，两极间产生电压降，射线能变成电能，并以脉冲的形式，转入定标器。

## (二) 闪烁计数器

液体闪烁测量方法是近二十年出现的一种测量放射性的新技术，它适用于测量 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 等低能 $\beta$ 放射性强度，在生物化学、放射医学、有机化学和生物物理学等方面都得到广泛的应用。此法具有灵敏度高，测量时间短、便于重复测量等优点。

液体闪烁测量的基本原理是;闪烁液能吸收辐射能量,并且再以光能的形式发射出来,产生荧光。荧光光子经过一定的光收集系统,打在光电倍增管的光阴极上转换为电脉冲,最后为定标器记录。

最简单的液体闪烁计数器是单管液体闪烁计数器,它由光电倍增管、前置放大器、主放大器,脉冲高度甄别器和定标器组成。

液体闪烁计数器的基本结构如图 6-2。

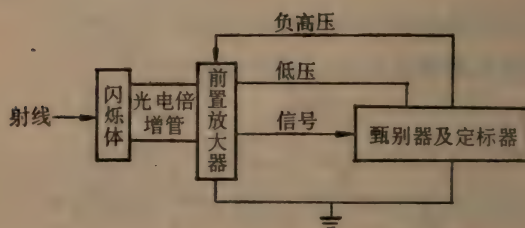


图 6-2 闪烁计数器方块图

### 三、放射自显影术

放射性同位素发射的射线,能使照相胶片感光,如将感光胶片附着于含有放射性的标本或组织切片上,经过曝光、显影、定影等步骤、在胶片上相当于标本或组织上含有放射性的部位、就出现黑色的颗粒。这种技术叫做放射自显影术。所得到的影像、称为放射自显影谱。利用放射自显影术能在细胞结构完整的情况下,研究某些生物大分子(如核酸、蛋白质、脂肪和酶等)在生物合成过程中的精细定位。

这种测量方法不需要复杂贵重的仪器,又有其它方法所不能替代的实用价值,是一种很有发展前途的研究手段。



#### 四、放射性同位素法的优缺点

放射性同位素法的灵敏度非常高，最灵敏的光谱分析法可以鉴定  $10^{-9}$  克的物质而  $10^{-14}$ — $10^{-16}$  克的放射性物质就可以相当准确地被测出。放射性同位素实验可在生理条件下进行，如将代谢物、药物等用同位素标记后投入生物体内，可以不经提取或提纯的手续便可追踪这些物质在生理条件下的代谢转变。

近十年来，由于同位素法与其他技术相结合又发展了它的应用范围。如“放射免疫法”，利用放射性底物进行酶活力的测定方法等可以测定极微量的活性物质。同位素技术和层析，电泳等方法相结合也广泛用于核酸和蛋白质等物质的分离和结构测定。

同位素示踪法简便易行。能够揭示其他方法目前还不能发现的事实。生物化学近年来在各个领域中所取得的成就都与这种技术的应用分不开。

放射性同位素的应用虽然有上述的许多优点，但在使用上也存在一些缺点和限制。如目前许多放射性物质还不易得到，也比较昂贵。放射性同位素的最大缺点是有损伤性。在使用放射性同位素时，必须防止射线对于人体的伤害。因此工作人员应具有一定的防护知识和熟练的操作技能。要严格防止放射性物质由呼吸道，口腔及皮肤各渠道进入体内。应尽量减少身体接受外照射的剂量(可从使用屏障物，进行远距离操作或缩短操作时间等采取多方面措施)，同时要避免污染工作环境。

## 第七章 Warburg 氏呼吸计测压法

### 一、基本原理

在温度固定和体积不变的条件下反应系统中某气体量的变化可以从其所表现的压力的变化测量出来。Warburg 氏呼吸计就是根据这个熟知的气体定律设计出来的。此法操作简便，所需材料微少，比较精确。常用来测定一些吸收气体或释放气体的生物化学反应。如琥珀酸的测定（琥珀酸在琥珀酸氧化酶作用下吸收氧气产生丁烯二酸），谷氨酸和丙酮酸的测定（谷氨酸和丙酮酸在相应的脱羧酶的作用下产生二氧化碳），组织或细胞的呼吸（吸收氧气放出二氧化碳）等。

### 二、仪器的构造

Warburg 氏呼吸计有恒温水槽和压力计（及反应瓶）两部分（图 7-1）。

恒温水槽中装有搅拌器，其温度变化不超过  $\pm 0.05^{\circ}\text{C}$ 。水槽两侧安装有压力计的架子，用马达带动，可以往复摇摆。

压力计由反应瓶 F、反应瓶侧臂 S、压力计 M、三通活塞 T 及

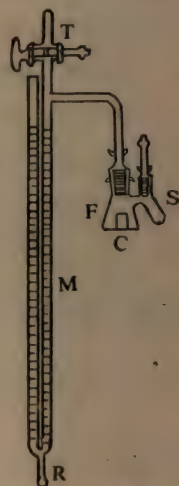


图 7-1 压力计结构

贮液器 R 五部分组成。反应瓶以磨口与压力计相接, 它的底部有一个中央小杯, 压力计为粗细均匀的 U 形毛细玻璃管, 二臂具有同样的刻度(由下而上, 刻度由 0 到 300 毫米)。其中一臂与大气相通称为开臂, 另一臂通过支管连接反应瓶, 其上端具有一个三通活塞 T。当三通活塞关闭时, 这一臂不与外界相通, 因此称为闭臂。在 U 形管底部 R 处连接一段乳胶管, 管的下口用玻璃棒塞住, 管内充满 Brodie 氏溶液 (此溶液比重为 1.033, 配制方法见实验三十六), 利用压在乳胶管上的带螺旋的板, 可调节压力计内液柱高低。

### 三、仪器使用的理论和操作要点

#### (一) 操作要点和计算方法

Warburg 氏呼吸计常被用来测定一个反应中氧气的吸收量。此时在反应瓶中所装物质的反应是吸收氧气的, 如在反应前使瓶内充满氧气(有时亦可以使用空气), 氧气的吸收量就可以从反应瓶中气体压力的减少计算出来。如果在反应过程中同时有二氧化碳产生, 就在反应瓶中央小杯中放入少量浓氢氧化钾将它吸收。测定时先将反应瓶上活塞和与压力计连通的部位严密封闭, 然后将整个压力计浸在预先调好温度的恒温水槽中并使其与水槽中温度达到平衡。反应开始时调节压力计 U 形管闭臂的液面使达到零点(测气体的吸收时, 零点一般定在 250 毫米或 150 毫米处)。记录开臂处液面的高度, 然后再关闭三通活塞, 使压力计往复摆动。以后每次读数时都要先将闭臂液面升到零点, 再记录开臂的读数。反应終了时开臂液面总的降低量就代表反应时间内氧气被吸收的总量(详细操作步骤见实验三十六)。

设气体消耗量为  $x$ , 反应后压力计上读出的压力变化为  $h$ , 则

$x = Kh$ 。  $K$  是反应瓶常数。

$$K = \frac{V_g \frac{273}{T} + V_f \alpha}{P_o}$$

式中  $T = 273 + \text{水槽温度} (^{\circ}\text{C})$

$V_g$  = 反应瓶中气体体积

$V_f$  = 反应瓶中液体体积

$\alpha$  = 被吸收气体在温度  $T$  及一个大气压时的溶解度

$P_o = 760 \times 13.60 / \text{压力计中液体的比重}$

若在  $30^{\circ}\text{C}$ , 以 Brodie 溶液作压力计中溶液以测定氧的吸收, 则

$$P_o = 760 \times \frac{13.6}{1.033} = 10,000 \text{ 毫米}$$

$$T = 273 + 30 = 303^{\circ}\text{C}$$

$\alpha_{O_2} = 0.0261$  ( $30^{\circ}\text{C}$  时氧在溶液中的溶解度)

$V_f$  = 反应时加入反应瓶中液体的体积

$V_g$  = 反应瓶体积 - 反应瓶内液体体积 ( $V_f$ )

$P_o$ 、 $T$ 、 $\alpha_{O_2}$ 、 $V_f$  均为常数, 反应瓶体积可以预先测定 (每一支压力计的反应瓶体积都不同)。

根据以上数值可以计算反应瓶常数  $K$ , 从  $K$  和压力变化  $h$  可以推算出气体的吸收量  $x$ 。

## (二) 温压计

压力计中压力的改变还受室内大气压力和水槽温度变化的影响, 所以实验时必须同时用一支压力计校正温度和压力的变化, 其反应瓶内加入与反应液相等体积的水或缓冲液。这支压力计叫做温压计。反应后温压计液柱面上升即表示在反应过程中大气压力下降或水槽温度升高。如果测定氧的吸收, 在有样品的压力计中液面下降, 则观察数值比实际数值下降的要小, 所以应该将温压计



液柱上升的数值加到观察值中去。如果温压计液柱降低，则应把温压计降低的数值从观察值中减去(图 7-2)。

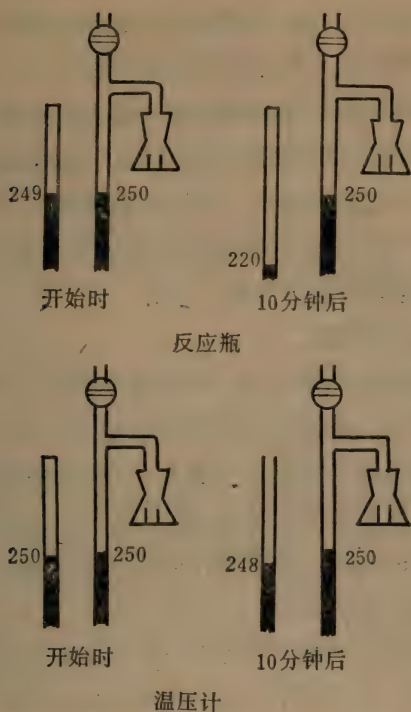


图 7-2 反应瓶和温压计上的压力改变

### (三) 反应瓶体积的测定

反应瓶体积测定一般采用较精确的汞称重法，大约可分几步操作。

1. 仪器洗涤：测体积时，压力计和反应瓶必须干燥洁净。将压力计U形玻璃管下口连一小段橡皮管，然后将压力计开臂上端与水泵相连。打开活塞，将压力计磨口接头浸入铬酸洗液中，用水泵将洗液抽入压力计中，浸泡过夜后用水冲净。再依次抽入蒸馏

水、乙醇和乙醚。在磨口接头处放一小块棉花,然后抽入空气,用气流将压力计吹干。用软纸或棉花蘸些煤油擦去反应瓶口及侧臂玻璃塞等处的油脂后,放入铬酸洗液中浸泡过夜。然后依次用自来水、蒸馏水冲净。在  $60^{\circ}\text{C}$  干燥箱内干燥。

2. 汞的清洁: 将干净的橡皮管一端连接小漏斗,另一端连接一小段毛细玻璃管(可用破损的温度计),使汞从漏斗中通过毛细管逐滴滴入 30% 硝酸溶液中。然后将硝酸倾出,用水洗汞数次至洗液不再显酸性为止。用滤纸吸去汞表面的水份,再用干滤纸过滤,过滤时需将滤纸底部用针刺一小孔。

### 3. 反应瓶体积测定

在反应瓶内装满纯净的汞,用头部弯曲的小玻璃棒赶去附在反应瓶内壁的气泡。把装有汞的反应瓶接上压力计,调整汞量,使汞达到压力计磨口接头上高约一厘米处,在汞柱液面处画一记号。用毛笔刷去反应瓶外部附着的汞,取下压力计,立即将温度计插入反应瓶中测量汞的温度。注意操作时避免用手握住反应瓶,以免影响瓶内汞的温度造成误差。

取一段橡皮管,一端连接漏斗,另一端连接压力计闭臂上端。从漏斗中倒入汞,用手自下而上捏橡皮管以除去汞中的气泡。打开压力计活塞,让汞流入压力计中,调节压力计的倾斜度,使汞的一端达到零点(250 毫米或 150 毫米处),另一端达到磨口接头上高约一厘米所画记号处(图 7-3)。关闭活塞,倾斜压力计使其中

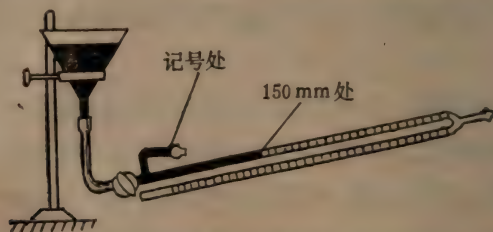


图 7-3 反应瓶体积的测定

全部的汞自U形管下口流至已知重量的称量瓶中。合并反应瓶内的汞,称重。如此重复3次,取平均值。从表7-1中该温度时汞的密度计算体积。平行测定的误差不应超过0.1%。

汞是毒品,凡涉及汞的操作均应放在大磁盘中进行以避免汞落在桌上或地上。如果不慎将汞落在地上无法收集时,可撒一些硫磺粉在汞上。压力计的U形管和支管部分均易折断或碰碎,操作时应十分谨慎。

表 7-1 计算反应瓶常数所用的数据

温 度(°C)	20	25	30	35	37	40
汞的密度	13.5462	13.5340	13.5217	13.5095	13.5046	13.4973
$\alpha_{O_2}$	0.0310	0.0283	0.0261	0.0244	0.0239	0.0231
$\alpha_{CO_2}$	0.878	0.759	0.665	0.592	0.567	0.530

至于反应中所放出的二氧化碳的测定可以同时用两套压力计,在一个反应瓶中加入浓碱溶液,另一个瓶中不放浓碱,从二个压力计读数的差就可以计算出呼吸过程中二氧化碳的放出量。其细节可参考有关书籍。

## 第八章 实验样品的制备

在基础生化实验中最常用的实验样品是组织样品，血样品或尿样品。组织样品常采用动物的肝、肾、胰或肌肉组织；植物的叶、幼芽；微生物中的酵母或培养的微生物，如大肠杆菌等。人或动物的血样品常采用全血、血浆、血清或血滤液。现将这些样品的制备方法摘要介绍如下：

### 一、组织样品

如生物组织离体过久，其所含物质的含量和生物活性都将发生变化。因此，当利用离体组织作为提取材料或代谢研究材料时，应在冰冷条件下尽快处理。一般采用断头法杀死动物，立即取出脏器或组织，除去外层脂肪及结缔组织并用冰冷的生理盐水洗去血液后，再用滤纸吸干。迅速称重后，根据实验的不同要求，按以下方法制成实验样品。

1. 组织糜 将动物组织用剪刀或绞肉机迅速剪成糜状。

2. 组织匀浆 向剪碎的动物组织中加入适量冰冷的匀浆制备液，用高速电动匀浆器或玻璃匀浆器制成匀浆。常用的玻璃匀浆器有5毫升和10毫升两种，由一个磨砂玻璃套管和一个带有磨砂玻璃杵头的杵组成。玻璃杵的外壁必须紧靠玻璃套管的内壁。用时，将套管放入冰浴中，将玻璃杵与调速马达连接，待将剪碎的组织悬浮于匀浆制备液中并倾入套管中后，把杵再插入套管中。开动马达并调节杵的转速。用手扶住套管口部，不断上下移动（肝组织约8—15次），直至组织碎块磨成匀浆为止（见图8-1）。



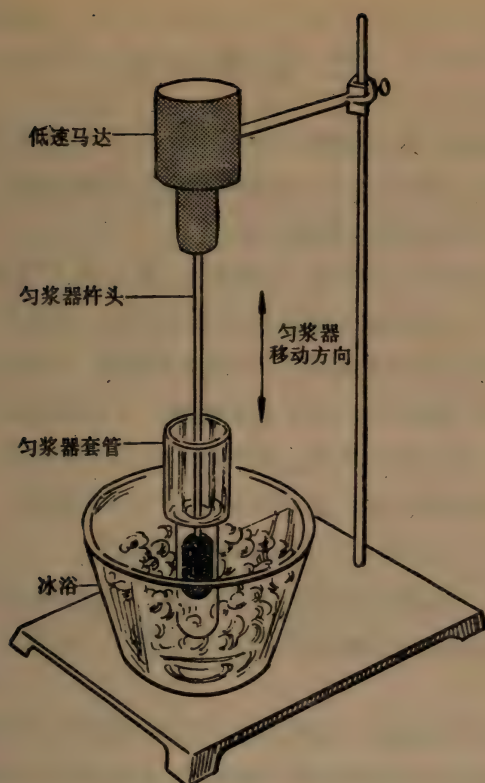


图 8-1 组织匀浆制备

匀浆制备液通常用生理盐水、0.25 摩尔/升蔗糖或适当的缓冲液。

3. 组织浸出液 组织匀浆离心后所得的上清液即组织浸出液。

植物的新鲜组织常在称重后置于研钵中，再加少量的介质和清洁的细砂研磨成匀浆，最后稀释到需要的浓度。测定植物种子中不易变化的成分时，常用烘干的粉末作为样品。

## 二、血液样品

收集动物或人的血液时应使用干燥的器皿,以防止溶血。

1. 全血: 取出血液后, 迅速盛于含有抗凝剂的干燥试管内混匀(注意避免激烈振荡), 即得全血。

常用的抗凝剂有草酸盐、柠檬酸盐、氟化钠、肝素等, 根据实验的要求而定, 一般情况下使用廉价的草酸盐。抗凝剂的使用量不宜过多, 通常每毫升血液加 1—2 毫克草酸盐, 5 毫克柠檬酸盐、5—10 毫克氟化钠或 0.01—0.2 毫克肝素。可将抗凝剂配成适当浓度的水溶液, 然后取 0.5 毫升放在收集血的小试管中并横放蒸干(用肝素为抗凝剂时, 蒸干温度不应超过  $30^{\circ}\text{C}$ ) 备用。

2. 血浆 全血离心后的上清液即为血浆。

3. 血清 不加抗凝剂的血液在室温下自行凝固后约需 3 小时可分离出血清, 也可离心分离以缩短时间。应及早分离血清以避免溶血。

4. 无蛋白血滤液 分析血液中某些成分时, 要避免蛋白质的干扰, 故需预先除去血中的蛋白质成分, 制成无蛋白滤液。可以根据实验的特殊要求选用不同的蛋白沉降剂。常用的蛋白沉降剂有钨酸、三氯乙酸和氢氧化锌。

## 三、尿液样品

一般定性实验使用随时收集的尿液样品, 但一天之中各次排出的尿液成分因饮食状况和生理条件的不同有很大的差异。因此, 定量测定尿液中各种成分时应收集 24 小时的尿液, 混合后再取样。人通常在早晨一定的时间排尿, 弃去尿液。将以后每次排出

的尿液都收集在一起,包括第二天早晨同一时间排出的尿液。把收集的 24 小时尿液充分混合后测量其总体积,然后取样分析。收集的尿液应放在冷处保存,最好立即进行实验。也可在收集尿的瓶中预先放入防腐剂,通常每升尿中约加入 5 毫升甲苯或 5 毫升盐酸。收集实验动物的尿液时,可将动物放在代谢笼中,再按以上方法通过笼下的漏斗收集动物 24 小时的尿液。

## 第二篇 学 生 实 验

本书采用国际单位(SI)制。摩尔浓度用摩尔/升(相当于  $M$ )表示;当量浓度用当量/升(相当于  $N$ )表示(参见第一章)。

在每个学生实验的试剂和材料一项中都列出了每 20 个学生(一般 1 人 1 组)所需用的量。我们在估计试剂用量时考虑了:

1. 实验指导上各操作步骤需要量。
2. 实验重复的可能性及重复次数。
3. 润洗实验容器及分装损失量。
4. 学生操作水平。
5. 配制的方便。

凡我们在教学中采用过的实验的试剂用量已按历年实际用量加以调整,可供参考。我们建议各新校建立实验档案,即每个实验建立一套卡片,除记录本实验所需物品及试剂配制方法外,并详细记载历年药品器材实际需用量,教学组织和效果,学生测定的数据,实验中易出现的疑问和异常情况以及解决办法,参考文献等以积累自己的教学经验。



## 第九章 蛋白质的化学

### 实验一 总氮量的测定

#### 凯氏 (Micro-Kjeldahl) 定氮法

##### 一、目的:

学习凯氏定氮法的原理和操作技术。

##### 二、原理:

常用凯氏定氮法测定天然有机物(如蛋白质, 核酸及氨基酸等)的含氮量。

含氮的有机物与浓硫酸共热时, 其中的碳、氢二元素被氧化成二氧化碳和水, 而氮则转变成氨, 并进一步与硫酸作用生成硫酸铵。此过程通常称之为“消化”。

但是, 这个反应进行得比较缓慢, 通常需要加入硫酸钾或硫酸钠以提高反应液的沸点, 并加入硫酸铜作为催化剂, 以促进反应的进行。甘氨酸的消化过程可表示如下:



浓碱可使消化液中的硫酸铵分解, 游离出氨, 借水蒸汽将产生的氨蒸馏到一定量, 一定浓度的硼酸溶液中, 硼酸吸收氨后使溶液中氢离子浓度降低, 然后用标准无机酸滴定, 直至恢复溶液中原来氢离子浓度为止, 最后根据所用标准酸的当量数(相当于待测物中氨的当量数)计算出待测物中的总氮量。

##### 三、器材:

1. 100 毫升凯氏烧瓶。
2. 凯氏定氮蒸馏装置。
3. 50 毫升容量瓶。
4. 3 毫升微量滴定管。
5. 分析天平。
6. 烘箱。
7. 电炉。
8. 1000 毫升蒸馏烧瓶。
9. 小玻璃珠。

#### 四、试剂:

- |  |         |
|--|---------|
| 1. 化学纯浓硫酸                                      | 200 毫升  |
| 2. 粉末硫酸钾-硫酸铜混合物                                | 16 克    |
| $K_2SO_4$ 与 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 以 3:1 配比研磨混合。 |         |
| 3. 30% 氢氧化钠溶液                                  | 1000 毫升 |
| 4. 2% 硼酸溶液                                     | 500 毫升  |
| 5. 标准盐酸溶液 (约 0.01 当量/升)                        | 600 毫升  |
| 6. 混合指示剂 (田氏指示剂)                               | 50 毫升   |

由 50 毫升 0.1% 甲烯蓝乙醇溶液与 200 毫升 0.1% 甲基红乙醇溶液混合配成, 贮于棕色瓶中备用。这种指示剂酸性时为紫红色, 碱性时为绿色。变色范围很窄且灵敏。

- |                            |       |
|----------------------------|-------|
| 7. 市售标准面粉和富强粉 <sup>①</sup> | 各 2 克 |
|----------------------------|-------|

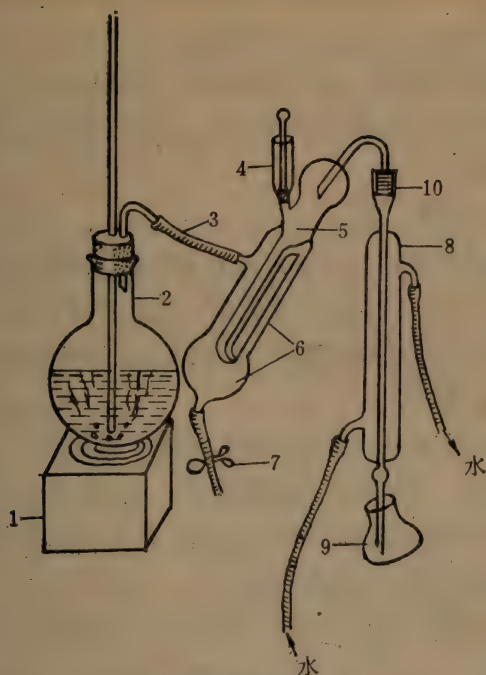
#### 五、操作方法:

1. 凯氏定氮仪的构造和安装:

凯氏定氮仪由蒸汽发生器, 反应管及冷凝器三部分组成。见图。

---

① 进行实验时可让部分同学用标准面粉, 部分同学用富强粉进行测定。



微量凯氏蒸馏装置

蒸气发生器包括电炉及一个1~2升容积的烧瓶(图中1,2)。蒸气发生器借橡皮管(图中3)与反应管相连,反应管上端有一个玻璃杯(图中4),样品和碱液可由此加入到反应室(图中5)中,反应室中心有一长玻璃管,其上端通过反应室外层(图中6)与蒸汽发生器相连,下端靠近反应室的底部。反应室外层下端有一开口,上有一皮管夹(见图中7),由此可放出冷凝水及反应废液。反应产生的氨可通过反应室上端细管及冷凝器(图中8)通到吸收瓶(图中9)中,反应管及冷凝器之间借磨口(图中10)连接起来,防止漏气。

安装仪器时,先将冷凝器垂直地固定在铁支台上,冷凝器下端不要距离实验台太近,以免放不下吸收瓶。然后将反应管通过磨

口连接(图中 10)与冷凝器相连,根据仪器本身的角度将反应管固定在另一铁支台上。这一点务须注意,否则容易引起氨的散失及反应室上端弯管折断。然后将蒸汽发生器放在电炉上,并用橡皮管把蒸汽发生器与反应管连接起来,安装完毕后,不得轻易移动,以免仪器损坏。

## 2. 样品处理:

某一固体样品中的含氮量是用 100 克该物质(干重)中所含氮的克数来表示(%).因此在定氮前,应先将固体样品中的水份除掉。一般样品烘干的温度都采用  $105^{\circ}\text{C}$ ,因为非游离的水,都不能在  $100^{\circ}\text{C}$ 以下烘干。

在称量瓶中称入一定量磨细的样品,然后置于  $105^{\circ}\text{C}$ 的烘箱内干燥 4 小时。用坩埚钳将称量瓶放入干燥器内,待降至室温后称重,按上述操作继续烘干样品。每干燥 1 小时后,称重一次,直到两次称量数值不变,即达恒重。

若样品为液体(如血清等),可取一定体积样品直接消化测定。精确称取 0.1 克左右的干燥面粉作为本实验的样品。

## 3. 消化:

取四个 100 毫升凯氏烧瓶并标号。各加 1 颗玻璃珠,在 1 及 2 号瓶中各加样品 0.1 克,催化剂 200 毫克,浓硫酸 5 毫升,注意加样品时应直接送入瓶底;而不要沾在瓶口和瓶颈上。在 3 及 4 号瓶中各加 0.1 毫升蒸馏水和与 1 及 2 号瓶相同量的催化剂和浓硫酸,作为对照,用以测定试剂中可能含有的微量含氮物质。每个瓶口放一漏斗,在通风橱内的电炉上消化<sup>①</sup>。

在消化开始时应控制火力,不要使液体冲到瓶颈。待瓶内水汽蒸完,硫酸开始分解并放出  $\text{SO}_2$  白烟后,适当加强火力,继续消

---

① 也可在“远红外消煮炉”内进行消化。



化,直至消化液呈透明淡绿色为止<sup>①</sup>。消化完毕,等烧瓶内容物冷却后,加蒸馏水 10 毫升(注意慢加,随加随摇)。冷却后将瓶内容物倾入 50 毫升的容量瓶中,并以蒸馏水洗烧瓶数次,将洗液并入量瓶。用水稀释到刻度,混匀备用<sup>②</sup>。

#### 4. 蒸馏:

(1) 蒸馏器的洗涤:蒸汽发生器中盛有用几滴硫酸酸化的蒸馏水。关闭皮管夹 7,将蒸汽发生器中的水烧开,让蒸汽通过整个仪器。约 15 分钟后,在冷凝器下端放一个盛有 5 毫升 2% 硼酸溶液和 1—2 滴指示剂混合液的锥形瓶。位置倾斜如图,冷凝器下端应完全浸没在液体中,继续蒸汽洗涤 1—2 分钟,观察锥形瓶内的溶液是否变色,如不变色则证明蒸馏装置内部已洗涤干净。向下移动锥形瓶,使硼酸液面离开冷凝管口约 1 厘米,继续通蒸汽 1 分钟。最后用水冲洗冷凝管口,然后用手捏紧橡皮管 3,由于反应室外层蒸气冷缩,压力减低,反应室内凝结的水可自动吸出进入 6,打开皮夹 7,将废水排出。

(2) 蒸馏:取 50 毫升锥形瓶数个,各加 5 毫升硼酸和 1—2 滴指示剂,溶液呈紫色,用表面皿复盖备用。

用吸管取 10 毫升消化液,细心地由蒸馏器小玻璃杯注入反应室,塞紧玻璃棒玻璃塞。将一个含有硼酸和指示剂的锥形瓶放在冷凝器下,使冷凝器下端浸没在液体内部。

用量筒取 30% 的氢氧化钠溶液 10 毫升放入小玻璃杯(图中 4),轻提棒状玻璃塞使之流入反应室(为了防止冷凝管倒吸,液体

---

① 并非所有样品消化液透明时消化作用即已完成。另外消化液的颜色亦常因样品成份的不同而异。因此,每测一新样品时,最好先试验一下需多少时间才能使样品中的有机氮全部变成无机氮。以后即以此时间为标准。本实验至消化液呈透明淡绿色时即消化完全,约需 2—3 小时。

② 本实验可分两次完成,第一次进行消化,第二次进行蒸馏。

流入反应室必须缓慢)。尚未完全流入时,将玻璃塞盖紧,向玻璃杯中加入蒸馏水约 5 毫升。再轻提玻璃塞,使一半蒸馏水慢慢流入反应室,一半留在玻璃杯中作水封。加热水蒸汽发生器,沸腾后夹紧夹子 7 开始蒸馏。此时锥形瓶中的酸溶液由紫色变成绿色。自变色时起记时,蒸馏 3—5 分钟。移动锥形瓶,使硼酸液面离开冷凝管约 1 厘米,并用少量蒸馏水洗涤冷凝管口外面。继续蒸馏 1 分钟,移开锥形瓶,用表面皿复盖锥形瓶。

蒸馏完毕后,须将反应室洗涤干净。在小玻璃杯中倒入蒸馏水,待蒸气很足、反应室外壳 6 温度很高时,一手轻提棒状玻璃塞使冷水流入反应室,同时立即用另一只手捏紧橡皮管 3,则 6 内蒸气冷缩,可将 5 中残液自动吸出,再用蒸馏水自 4 倒入 5,重复上述操作。如此冲洗几次后,将 7 打开,将 6 中废液排出。再继续下一个蒸馏操作。

待样品和空白消化液均蒸馏完毕后,同时进行滴定。

(3) 滴定:全部蒸馏完毕后,用标准盐酸溶液滴定各锥形瓶中收集的氨量,硼酸指示剂溶液由绿变淡紫色为滴定终点。

(4) 计算:

$$\text{总氮量} = \frac{N(V_1 - V_2) \times 0.014 \times 100}{w} \times \frac{\text{消化液总量(毫升)}}{\text{测定时消化液用量(毫升)}} \times \%$$

$N$ : 标准盐酸溶液当量浓度。

$V_1$ : 滴定样品用去的盐酸溶液平均毫升数。

$V_2$ : 滴定空白消化液用去的盐酸溶液平均毫升数。

$w$ : 样品重量(克)

14: 氮的原子量。

若测定的样品含氮部分只是蛋白质,则,

$$\text{样品中蛋白质含量}(\%) = \text{总氮量} \times 6.25$$

若样品中除有蛋白质外,尚有其它含氮物质,则需向样品中加入三氯乙酸,然后测定未加三氯乙酸的样品及加入三氯乙酸后样品上清液中的含氮量,得出非蛋白氮及总氮量,从而计算出蛋白氮,再进一步算出蛋白质含量。

蛋白氮 = 总氮 - 非蛋白氮

蛋白质含量(克%) = 蛋白氮  $\times$  6.25

## 实验二 氨基酸的分离鉴定——纸层析法

### 一、目的:

通过氨基酸的分离,学习纸层析法的基本原理及操作方法。

### 二、原理:

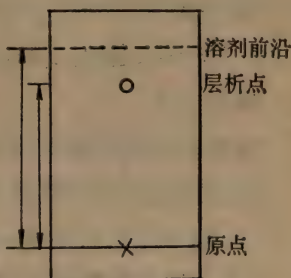
纸层析法是用滤纸作为惰性支持物的分配层析法。

层析溶剂由有机溶剂和水组

成。

物质被分离后在纸层析图谱上的位置是用  $R_f$  值(比移)来表示的:

$$R_f = \frac{\text{原点到层析点中心的距离}}{\text{原点到溶剂前沿的距离}}$$



在一定的条件下某种物质的  $R_f$  值是常数。 $R_f$  值的大小与物质的结构、性质、溶剂系统、层析滤纸的质量和层析温度等因素有关。本实验利用纸层析法分离氨基酸。

### 三、器材:

#### 1. 层析缸①;

① 本实验所用层析缸是用大的标本缸代替的。若用标准的层析缸,滤纸平衡后应用长颈漏斗从层析缸上部小孔中加入扩展剂。



2. 毛细管;
3. 喷雾器;
4. 培养皿;
5. 层析滤纸(新华一号)。

#### 四、试剂:

1. 扩展剂: 650 毫升

是 4 份水饱和的正丁醇和 1 份醋酸的混合物。将 20 毫升正丁醇和 5 毫升冰醋酸放入分液漏斗中, 与 15 毫升水混合, 充分振荡, 静置后分层, 放出下层水层。取漏斗内的扩展剂约 5 毫升置于小烧杯中做平衡溶剂, 其余的倒入培养皿中备用。

2. 氨基酸溶液: 0.5% 的赖氨酸、脯氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸溶液及它们的混合液(各组份浓度均为 0.5%)。

各 5 毫升

3. 显色剂 50—100 毫升

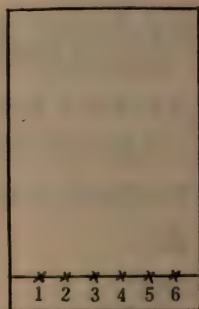
0.1% 水合茚三酮正丁醇溶液。

#### 五、操作方法:

1. 将盛有平衡溶剂的小烧杯置于密闭的层析缸中。
2. 取层析滤纸(长 22 厘米, 宽 14 厘米)一张。在纸的一端距

边缘 2—3 厘米处用铅笔划一条直线, 在此直线上每间隔 2 厘米作一记号。

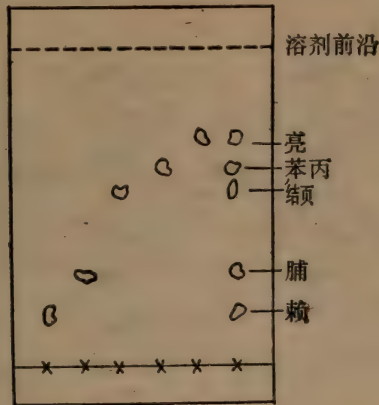
3. 点样: 用毛细管将各氨基酸样品分别点在这六个位置上; 干后再点一次。每点在纸上扩散的直径最大不超过 3 毫米。



4. 扩展: 用线将滤纸缝成筒状, 纸的两边不能接触。将盛有约 20 毫升扩展剂的培养皿迅速置于密闭的层析缸中, 并将滤纸直



立于培养皿中。(点样的一端在下, 扩展剂的液面需低于点样线 1 厘米。)待溶剂上升 15—20 厘米时即取出滤纸, 用铅笔描出溶剂前沿界线, 自然干燥或用吹风机热风吹干。



5. 显色: 用喷雾器均匀喷上 0.1% 茚三酮正丁醇溶液; 然后置烘箱中烘烤 5 分钟 ( $100^{\circ}\text{C}$ ) 或用热风吹干即可显出各层析斑点。

6. 计算各种氨基酸的  $R_f$  值。

### 实验三 蛋白质的性质实验(一) ——蛋白质及氨基酸的呈色反应

#### 一、目的:

1. 了解构成蛋白质的基本结构单位及主要联接方式。
2. 了解蛋白质和某些氨基酸的呈色反应原理。
3. 学习几种常用的鉴定蛋白质和氨基酸的方法。

#### 二、呈色反应:

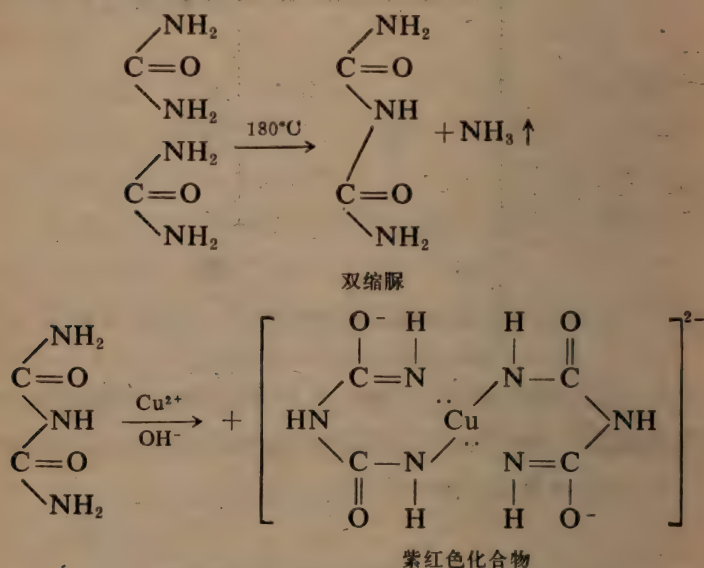
##### (一) 双缩脲反应:

##### 1. 原理:

尿素加热至  $180^{\circ}\text{C}$  左右, 生成双缩脲并放出一分子氨。双缩

脲在碱性环境中能与  $\text{Cu}^{2+}$  结合生成紫红色化合物，此反应称为双缩脲反应。蛋白质分子中有肽键，其结构与双缩脲相似，也能发生此反应。可用于蛋白质的定性或定量测定。

反应式如下：



双缩脲反应不仅为含有两个以上肽键的物质所有。含有一个肽键和一个  $-\text{CS}-\text{NH}_2$ ， $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ， $-\text{CRH}-\text{NH}_2$ ， $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ， $-\text{CHNH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$  或  $-\text{CHOHCH}_2\text{NH}_2$  等基团的物质以

及乙二酰二胺 ( $\text{O}=\text{C}-\text{NH}_2-\text{NH}_2-\text{C}=\text{O}$ ) 等物质也有此反应。 $\text{NH}_3$  也干扰此反应，因为  $\text{NH}_3$  与  $\text{Cu}^{2+}$  可生成暗蓝色的络离子  $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$ 。因此，一切蛋白质或二肽以上的多肽都有双缩脲反应，但有双缩脲反应的物质不一定是蛋白质或多肽。

## 2. 试剂：

### (1) 尿素：

10 克

(2) 10%氢氧化钠溶液	250 毫升
(3) 1%硫酸铜溶液	60 毫升
(4) 2%卵清蛋白溶液	80 毫升

### 3. 操作方法:

取少量尿素结晶,放在干燥试管中。用微火加热使尿素熔化。熔化的尿素开始硬化时,停止加热,尿素放出氨,形成双缩脲。冷却后,加10%氢氧化钠溶液约1毫升,振荡混匀,再加1%硫酸铜溶液1滴,再振荡。观察出现的粉红颜色。避免添加过量硫酸铜,否则,生成的蓝色氢氧化铜能掩盖粉红色。

向另一试管加卵清蛋白溶液约1毫升和10%氢氧化钠溶液约2毫升,摇匀,再加1%硫酸铜溶液两滴,随加随摇。观察紫玫瑰色的出现。

## (二) 茚三酮反应;

### 1原理:

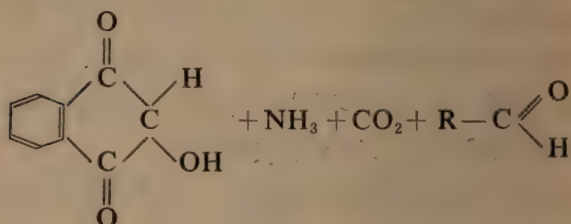
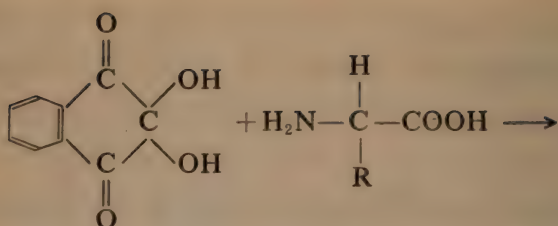
除脯氨酸、羟脯氨酸和茚三酮反应产生黄色物质外,所有 $\alpha$ -氨基酸及一切蛋白质都能和茚三酮反应生成蓝紫色物质。

$\beta$ -丙氨酸、氨和许多一级胺都呈正反应。尿素、马尿酸、二酮吡嗪和肽键上的亚氨基不呈现此反应。因此,虽然蛋白质和氨基酸均有茚三酮反应,但能与茚三酮呈阳性反应的不一定就是蛋白质或氨基酸。在定性定量测定中,应严防干扰物存在。

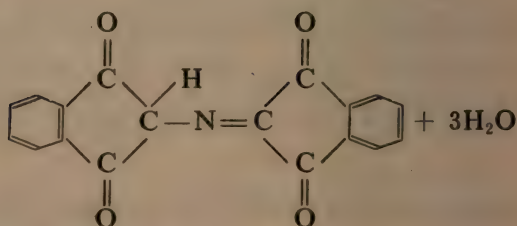
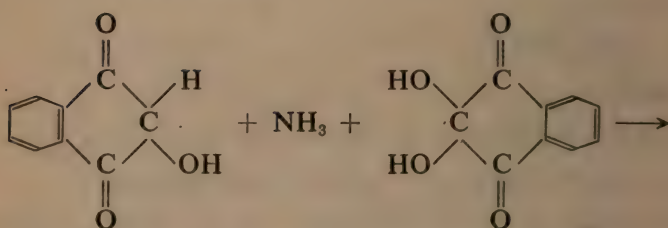
该反应十分灵敏,1:1,500,000浓度的氨基酸水溶液即能给出反应,是一种常用的氨基酸定量测定方法。

茚三酮反应分为两步,第一步是氨基酸被氧化形成 $\text{CO}_2$ 、 $\text{NH}_3$ 和醛,水合茚三酮被还原成还原型茚三酮;第二步是所形成的还原型茚三酮同另一个水合茚三酮分子和氨缩合生成有色物质。

反应机理如下:



还原型茚三酮



蓝紫色

此反应的适宜 pH 为 5—7，同一浓度的蛋白质或氨基酸在不同 pH 条件下的颜色深浅不同，酸度过大时甚至不显色。

## 2. 试剂:

### (1) 蛋白质溶液

100 毫升



2% 卵清蛋白或新鲜鸡蛋清溶液(蛋清:水=1:9)

(2) 0.5% 甘氨酸溶液 80 毫升

(3) 0.1% 茚三酮水溶液 50 毫升

(4) 0.1% 茚三酮-乙醇溶液 20 毫升

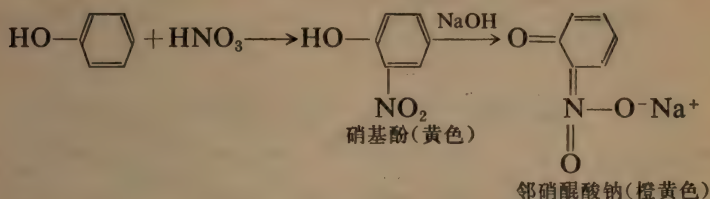
### 3. 操作方法:

(1) 取 2 支试管分别加入蛋白质溶液和甘氨酸溶液 1 毫升,再各加 0.5 毫升 0.1% 茚三酮水溶液,混匀,在沸水浴中加热 1—2 分钟,观察颜色由粉色变紫红色再变蓝。

(2) 在一小块滤纸上滴上一滴 0.5% 的甘氨酸溶液,风干后,再在原处滴上一滴 0.1% 的茚三酮乙醇溶液,在微火旁烘干显色,观察紫红色斑点的出现。

### (三) 黄色反应:

1. 原理:含有苯环结构的氨基酸,如酪氨酸和色氨酸,遇硝酸后,可被硝化成黄色物质,该化合物在碱性溶液中进一步形成深橙色的硝酞酸钠。反应式如下:



多数蛋白质分子含有带苯环的氨基酸,所以有黄色反应,苯丙氨酸不易硝化,需加入少量浓硫酸才有黄色反应。

### 2. 试剂:

(1) 鸡蛋清溶液 100 毫升

将新鲜鸡蛋的蛋清与水按 1:20 混匀,然后用六层纱布过滤。

(2) 大豆提取液 100 毫升

将大豆浸泡充分吸胀后研磨成浆状用纱布过滤。

- (3) 头发      (4) 指甲      (5) 0.5% 苯酚溶液 50 毫升  
 (6) 浓硝酸 200 毫升      (7) 0.3% 色氨酸溶液 10 毫升  
 (8) 0.3% 酪氨酸溶液      10 毫升  
 (9) 10% 氢氧化钠溶液      100 毫升

### 3. 操作方法:

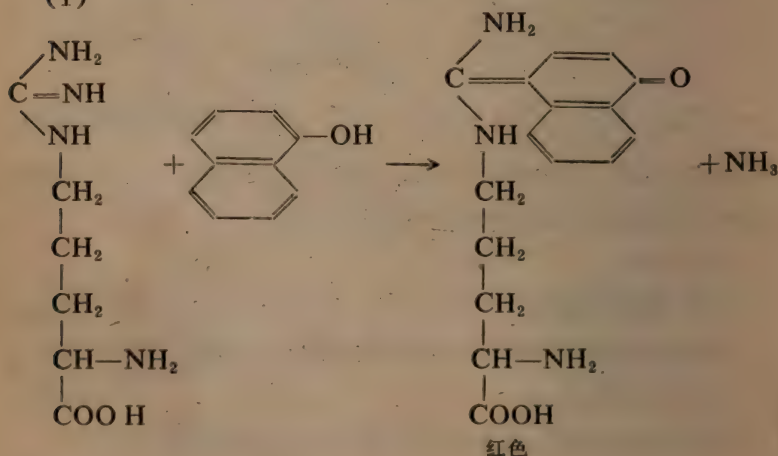
向 7 个试管中分别按下表加入试剂, 观察各管出现的现象, 有的试管反应慢可略放置或用微火加热。待各管出现黄色后, 于室温下逐滴加入 10% 氢氧化钠溶液至碱性, 观察颜色变化。

管 号	1	2	3	4	5	6	7
材 料	鸡蛋清溶液	大豆提取液	指甲	头发	0.5% 苯酚	0.3% 色氨酸	0.3% 酪氨酸
(滴)	4	4	少许	少许	4	4	4
浓硝酸(滴)	2	4	40	40	4	4	4
现象							

### (四) 坂口反应:

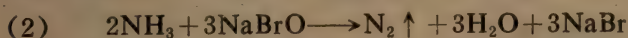
#### 1. 原理:

##### (1)



精氨酸和许多胍代化合物与  $\alpha$ -萘酚在碱性次溴酸钠溶液中发生反应, 产生红色物质。

反应式如上:



精氨酸是唯一呈正反应的氨基酸, 反应极为灵敏, 此反应可用于定性鉴定含有精氨酸的蛋白质和定量测定精氨酸。

## 2. 试剂:

(1) 0.3% 精氨酸溶液 10 毫升

(2) 蛋白质溶液 100 毫升

鸡蛋清: 水 = 1:20; 配法见“黄色反应”。

(3) 20% 氢氧化钠溶液 100 毫升

(4) 1%  $\alpha$ -萘酚乙醇溶液 20 毫升

临用时配制。

(5) 次溴酸钠溶液 10 毫升

2 克溴溶于 100 毫升 5% 氢氧化钠溶液中。置棕色瓶中, 可在冷暗处保存二周。

## 3. 操作方法:

向各试管中按下表加入试剂, 记录出现的现象。

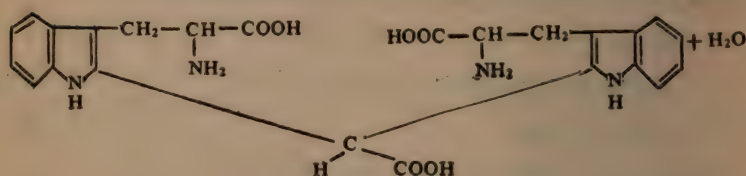
管号 \ 试剂 (滴)	H <sub>2</sub> O	0.3% 精氨酸	蛋白质溶液	20% NaOH	$\alpha$ -萘酚	NaBrO	现象
1	—	—	5	5	3	1	
2	4	1	—	5	3	1	
3	5	—	—	5	3	1	

本实验十分灵敏。 $\alpha$ -萘酚要过量。次溴酸钠、精氨酸及蛋白质均不可过多, 过多的次溴酸钠可继续氧化有色产物使颜色消失。

## (五) 乙醛酸反应:

### 1. 原理:

在浓硫酸存在下,色氨酸与乙醛酸反应生成紫色物质,反应机理尚不清楚,可能是一分子乙醛酸与两分子色氨酸脱水缩合形成与靛蓝相似的物质。



含有色氨酸的蛋白质也有此反应。

### 2. 试剂:

- |                      |        |
|----------------------|--------|
| (1) 蛋白质溶液            | 100 毫升 |
| 鸡蛋清:水 = 1:20         |        |
| (2) 0.03% 色氨酸溶液      | 10 毫升  |
| (3) 冰醋酸 <sup>①</sup> | 200 毫升 |
| (4) 浓硫酸(分析纯)         | 100 毫升 |

### 3. 操作方法:

管号	试剂 水 (滴)	0.03% 色氨酸 溶液(滴)	蛋白质溶液 (滴)	冰醋酸 (毫升)	浓硫酸 (毫升)	现 象
1	—	—	5	2	1	
2	4	1	—	2	1	
3	5	—	—	2	1	

取 3 支试管。编号。分别按上表加入蛋白质溶液、色氨酸溶液和水,然后各加入冰醋酸 2 毫升。混匀后倾斜试管,沿管壁分别

<sup>①</sup> 冰醋酸一般都含有乙醛酸杂质,故可用冰醋酸代替乙醛酸。



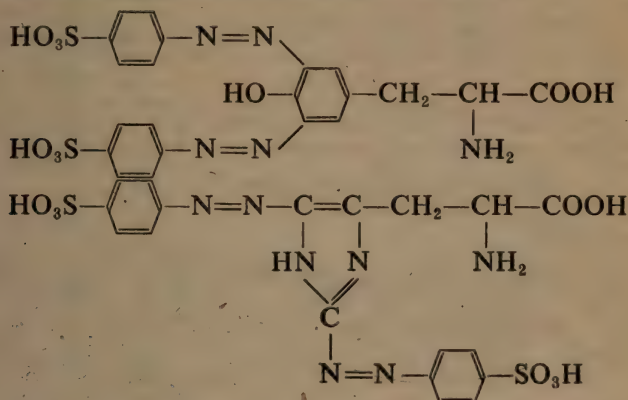
缓缓加入浓硫酸约 1 毫升, 静置。观察各管液面间紫色环的出现。若不明显, 可于水浴中微热<sup>①</sup>。

## (六) 偶氮反应:

### 1. 原理:

偶氮化合物与酚核或咪唑环结合产生有色物质。它与酪氨酸和组氨酸反应的产物分别为红色和樱桃红色。

偶氮苯磺酸与酪氨酸和组氨酸反应的产物如下:



含有酪氨酸和组氨酸的蛋白质也有此反应。

### 2. 试剂:

- |                      |       |
|----------------------|-------|
| (1) 鸡蛋清 <sup>②</sup> | 30 毫升 |
| (2) 0.3% 组氨酸溶液       | 10 毫升 |
| (3) 0.3% 酪氨酸溶液       | 10 毫升 |
| (4) 20% 氢氧化钠溶液       | 20 毫升 |
| (5) 重氮试剂             | 50 毫升 |

溶液 A: 5 克亚硝酸钠溶于 1000 毫升水中。

溶液 B: 5 克对氨基苯磺酸溶于 1000 毫升水中, 溶解后, 再加

① 本实验极为灵敏, 色氨酸和蛋白质的量不可过多。

② 稀释的鸡蛋清效果不好。

入 5 毫升浓硫酸。

A、B 液分别保存在密闭瓶中，用时以等体积混合。

### 3. 操作方法:

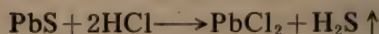
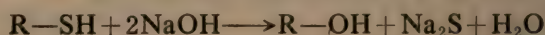
取 3 支试管，编号。按下表所示顺序和剂量加入试剂，并观察有色产物的形成。

管号 \ 试剂 (滴)	0.3% 组氨酸溶液	0.3% 酪氨酸溶液	鸡蛋清	重氮试剂	20% 氢氧化钠溶液	现象
1	4	—	—	8	2	
2	—	4	—	8	2	
3	—	—	4	8	2	

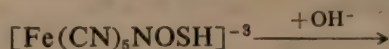
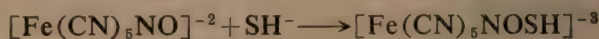
### (七) 醋酸铅反应及亚硝基铁氰化钠反应:

#### 1. 原理:

蛋白质分子中常含有半胱氨酸和胱氨酸，含硫蛋白质在强碱条件下，可分解形成硫化钠。硫化钠与醋酸铅反应生成黑色的硫化铅沉淀。若加入浓盐酸，就生成有臭味的硫化氢气体(蛋氨酸对强碱稳定，不发生此反应)。反应式如下:



含有一SH 的半胱氨酸与亚硝基铁氰化钠反应形成玫瑰色物质。反应式如下:



#### 2. 试剂:

(1) 蛋白质溶液 50 毫升

鸡蛋清:水=1:1

(2) 0.3% 半胱氨酸溶液 5 毫升

(3) 10% 氢氧化钠溶液 100 毫升

(4) 浓盐酸 100 毫升

(5) 0.5% 醋酸铅溶液 50 毫升

(6) 5% 亚硝基铁氰化钠溶液(有毒!) 5 毫升

(7) 醋酸铅试纸: 用 10% 醋酸铅水溶液浸泡滤纸条后晾干。

### 3. 操作方法:

(1) 向试管中加入 0.5% 醋酸铅溶液 1 毫升, 再加 10% 氢氧化钠溶液至产生的沉淀完全溶解为止。摇匀。加入被水稀释一倍的鸡蛋清 0.4 毫升。混匀, 小心加热, 至溶液变黑后, 加入浓盐酸数滴, 嗅其味, 并将湿润醋酸铅试纸置于管口, 观察其颜色的变化。

(2) 将一滴 0.3% 半胱氨酸溶液滴在白瓷盘的凹穴中, 加 10% 的氢氧化钠三滴, 再滴一滴 5% 亚硝基铁氰化钠溶液, 观察玫瑰红颜色的生成(此颜色不稳定, 很快消失)。

## 实验四 蛋白质的性质实验(二)——蛋白质的等电点测定和沉淀反应

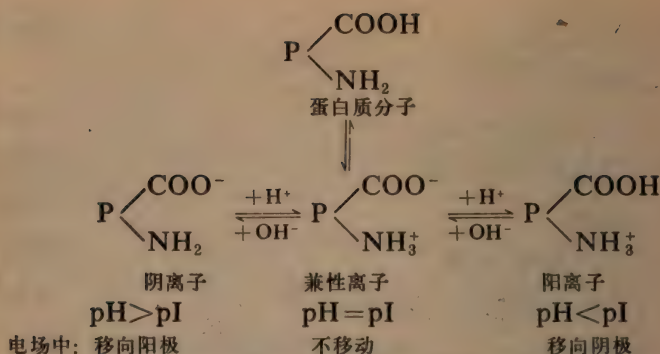
### 一、蛋白质等电点的测定:

#### 1. 目的:

- (1) 了解蛋白质的两性解离性质。
- (2) 学习测定蛋白质等电点的一种方法。

#### 2. 原理:

蛋白质是两性电解质。在蛋白质溶液中存在下列平衡:



蛋白质分子的解离状态和解离程度受溶液的酸碱度影响。当溶液的 pH 达到一定数值时, 蛋白质颗粒上正负电荷的数目相等, 在电场中, 蛋白质既不向阴极移动, 也不向阳极移动, 此时溶液的 pH 值称为此种蛋白质的等电点。不同蛋白质各有其特异的等电点。在等电点时, 蛋白质的理化性质都有变化, 可利用此种性质的变化测定各种蛋白质的等电点。最常用的方法是测其溶解度最低时的溶液 pH 值。

本实验借观察在不同 pH 溶液中的溶解度以测定酪蛋白的等电点。用醋酸与醋酸钠(醋酸钠混合在酪蛋白溶液中)配制成各种不同 pH 值的缓冲液。向诸缓冲溶液中加入酪蛋白后, 沉淀出现最多的缓冲液的 pH 值即为酪蛋白的等电点。

### 3. 器材:

- (1) 水浴锅。
- (2) 温度计。
- (3) 200 毫升锥形瓶。
- (4) 100 毫升容量瓶。
- (5) 吸管。
- (6) 试管。
- (7) 试管架。



## (8) 乳钵。

### 4. 试剂:

(1) 0.4% 酪蛋白醋酸钠溶液 200 毫升

取 0.4 克酪蛋白, 加少量水在乳钵中仔细地研磨, 将所得的蛋白质悬胶液移入 200 毫升锥形瓶内, 用少量  $40^{\circ}$ — $50^{\circ}\text{C}$  的温水洗涤乳钵, 将洗涤液也移入锥形瓶内。加入 10 毫升 1 当量/升醋酸钠溶液。把锥形瓶放到  $50^{\circ}\text{C}$  水浴中, 并小心地旋转锥形瓶, 直到酪蛋白完全溶解为止。将锥形瓶内的溶液全部移至 100 毫升容量瓶内, 加水至刻度, 塞紧玻塞, 混匀。

(2) 1.00 当量/升醋酸溶液 100 毫升

(3) 0.10 当量/升醋酸溶液 100 毫升

(4) 0.01 当量/升醋酸溶液 50 毫升

### 5. 操作方法:

(1) 取同样规格的试管 4 支, 按下表顺序分别精确地加入各试剂, 然后混匀<sup>①</sup>。

试管号	蒸 馏 水 (毫升)	0.01当量/升醋酸 (毫升)	0.1当量/升醋酸 (毫升)	1.0当量/升醋酸 (毫升)
1	8.4	0.6	—	—
2	8.7	—	0.3	—
3	8.0	—	1.0	—
4	7.4	—	—	1.6

(2) 向以上试管中各加酪蛋白的醋酸钠溶液 1 毫升, 加一管, 摇匀一管。此时 1、2、3、4 管的 pH 值依次为 5.9、5.3、4.7、3.5。观察其混浊度。静置 10 分钟后, 再观察其混浊度。最混浊的一管的 pH 即为酪蛋白的等电点。

<sup>①</sup> 在测定等电点的实验中, 要求各种试剂的浓度和加入量相当准确。

## 二、蛋白质的沉淀及变性:

### 1. 目的:

- (1) 加深对蛋白质胶体溶液稳定因素的认识。
- (2) 了解沉淀蛋白质的几种方法及其实用意义。
- (3) 了解蛋白质变性与沉淀的关系。

### 2. 原理:

在水溶液中的蛋白质分子由于表面生成水化层和双电层而成为稳定的亲水胶体颗粒,在一定的理化因素影响下,蛋白质颗粒可因失去电荷和脱水而沉淀。

蛋白质的沉淀反应可分为两类。

#### (1) 可逆的沉淀反应:

此时蛋白质分子的结构尚未发生显著变化,除去引起沉淀的因素后,蛋白质的沉淀仍能溶解于原来的溶剂中,并保持其天然性质而不变性。如大多数蛋白质的盐析作用或在低温下用乙醇(或丙酮)短时间作用于蛋白质。提纯蛋白质时,常利用此类反应。

#### (2) 不可逆沉淀反应:

此时蛋白质分子内部结构发生重大改变,蛋白质常变性而沉淀,不再溶于原来溶剂中。加热引起的蛋白质沉淀与凝固,蛋白质与重金属离子或某些有机酸的反应都属于此类。

蛋白质变性后,有时由于维持溶液稳定的条件仍然存在(如电荷),并不析出。因此变性蛋白质并不一定都表现为沉淀,而沉淀的蛋白质也未必都已变性。

### 3. 试剂与材料:

#### (1) 蛋白质溶液

500 毫升

5% 卵清蛋白溶液或鸡蛋清的水溶液

(新鲜鸡蛋清:水=1:9)

#### (2) pH4.7 醋酸-醋酸钠的缓冲溶液

100 毫升

(3) 3% 硝酸银溶液	10 毫升
(4) 5% 三氯乙酸溶液	50 毫升
(5) 95% 乙醇	250 毫升
(6) 饱和硫酸铵溶液	250 毫升
(7) 硫酸铵结晶粉末	1000 克
(8) 0.1 当量/升盐酸溶液	300 毫升
(9) 0.1 当量/升氢氧化钠溶液	100 毫升
(10) 0.1 当量/升碳酸钠溶液	100 毫升
(11) 0.1 当量/升醋酸溶液	100 毫升
(12) 甲基红溶液	20 毫升
(13) 2% 氯化钡溶液	150 毫升

#### 4. 操作方法:

##### (1) 蛋白质的盐析。

无机盐(硫酸铵、硫酸钠、氯化钠等)浓溶液能析出蛋白质。盐的浓度不同,析出的蛋白质也不同。

如球蛋白可在半饱和硫酸铵溶液中析出,而清蛋白则在饱和硫酸铵溶液中才能析出。

由盐析获得的蛋白质沉淀,当降低其盐类浓度时,又能再溶解,故蛋白质的盐析作用是可逆过程。

加 5% 卵清蛋白溶液 5 毫升于试管中,再加等量的饱和硫酸铵溶液,混匀后静置数分钟则析出球蛋白的沉淀。倒出少量混浊沉淀,加少量水,是否溶解,为什么?将管内容物过滤,向滤液中添加硫酸铵粉末到不再溶解为止,此时析出的沉淀为清蛋白。

取出部分清蛋白,加少量蒸馏水,观察沉淀的再溶解。

##### (2) 重金属离子沉淀蛋白质:

重金属离子与蛋白质结合成不溶于水的复合物。

取一支试管,加入蛋白质溶液 2 毫升,再加 3% 硝酸银溶液 1

—2 滴, 振震试管, 有沉淀发生。放置片刻, 倾出上清液, 向沉淀中加入少量的水, 沉淀是否溶解? 为什么?

### (3) 某些有机酸沉淀蛋白质:

取一支试管, 加入蛋白质溶液 2 毫升, 再加入 1 毫升 5% 三氯乙酸溶液, 振荡试管, 观察沉淀的生成。放置片刻, 倾出上清液, 向沉淀中加入少量水, 观察沉淀是否溶解。

### (4) 有机溶剂沉淀蛋白质。

取一支试管, 加入 2 毫升蛋白质溶液, 再加入 2 毫升 95% 乙醇。混匀, 观察沉淀的生成。

### (5) 乙醇引起的变性与沉淀。

取 3 支试管, 编号。依下表顺序加入试剂:

管号 \ 试剂(毫升)	5% 卵清蛋白溶液	0.1 当量/升 氢氧化钠溶液	0.1 当量/升 盐酸溶液	95% 乙醇	pH4.7 缓冲溶液
1	1	—	—	1	1
2	1	1	—	1	—
3	1	—	1	1	—

振摇混匀后, 观察各管有何变化。放置片刻。向各管内加水 8 毫升, 然后在第 2、3 号管中各加一滴甲基红, 再分别用 0.1 当量/升醋酸溶液及 0.1 当量/升碳酸钠溶液中和之。观察各管颜色的变化和沉淀的生成。每管再加 0.1 当量/升盐酸溶液数滴, 观察沉淀的再溶解。解释各管发生的全部现象。

## 三、尿蛋白定性检验:

### 1. 目的:

了解蛋白质沉淀反应及变性的实践意义, 掌握临床常规定性检验尿蛋白的方法。



## 2. 原理:

正常人尿中只含微量蛋白质,不能用临床常规方法测定出来。用临床常规方法能检查出蛋白质的尿叫做蛋白尿。患肾脏病的人(如患肾小球肾炎、肾盂肾炎)往往有蛋白尿,因而尿中蛋白质的检查在临床上具有重要的诊断意义。

## 3. 试剂:

(1) 2% 醋酸溶液 50 毫升

(2) 20% 磺酸水杨酸溶液 50 毫升

(3) pH 蛋白试纸

## 4. 操作方法:

### (1) 加热醋酸法:

尿中的蛋白质加热变性后溶解度降低,因此可以被沉淀出来,加入醋酸使尿液呈弱酸性后,蛋白质仍不易溶解,但因加热引起的磷酸盐混浊则在加入醋酸后消失,故二者可以区别。

取尿液 3 毫升置于试管中,加热至沸腾(试管应在火焰上移动,严防尿液喷出)。观察有无沉淀产生。若产生沉淀,则加入 2% 醋酸数滴使显酸性,然后观察沉淀情况。按下表记录结果。

观 察 所 得 结 果	记录附号	尿中蛋白质的浓度
有混浊或混浊在加入醋酸后消失	—	阴性
极轻微混浊,对着黑背影才看到	±	0.01%以上
混浊明显,但尚无颗粒状或絮状物产生	+	0.01—0.05%
颗粒状白色混浊,但尚无絮状物产生	++	0.05—0.2%
混浊浓厚,不透明而呈絮状	+++	0.2—0.3%
混浊甚浓,几乎完全凝固	++++	0.5%以上

(2) 磺酸水杨酸法:利用有机酸沉淀蛋白质,是临床常用的方法。此法较“加热醋酸法”更为灵敏,尿中蛋白质浓度为 0.0015%

即可检出。

① 取尿约 3 毫升加入试管中。

② 加入 20% 磺酸水杨酸 8—10 滴, 如出现沉淀, 表示尿中有蛋白质存在。参考上表, 按沉淀多少记录结果。

(3) 试纸法: 蛋白质与有机染料(如溴酚蓝)的离子结合, 可改变染料的颜色。使上述染料附着在滤纸上面制成蛋白试纸。当它接触含有蛋白质的溶液时, 因蛋白质含量不同, 试纸可以由黄色变成黄绿色、绿色或蓝绿色, 可根据颜色估计蛋白质的量。

① 本试纸供检查尿 pH 值及蛋白定性和半定量之用。其淡黄色部分供检查 pH 值用。

② 将本试纸浸入被检尿中后立即取出。约 10 秒钟后, 在自然光或白光下, 将所呈现的颜色和色版比较判定。

③ 强碱性尿的 pH 值在 8 以上者, 尿蛋白呈假阳性反应。可滴加稀醋酸校正后再测定。

④ 黄疸尿, 浓缩尿, 血尿等异常着色的标本, 可影响判定。

⑤ 蛋白试纸应存于阴凉干燥处。其带色部分不可用手接触。

## 实验五 血清蛋白的醋酸纤维薄膜电泳

### 一、目的:

学习醋酸纤维薄膜电泳的操作, 了解电泳技术的一般原理。

### 二、原理:

醋酸纤维薄膜电泳是用醋酸纤维薄膜作为支持物的电泳方法。

醋酸纤维薄膜由二乙酸纤维素制成, 它具有均一的泡沫样的结构, 厚度仅 120 微米, 有强渗透性, 对分子移动无阻力, 作为区带电泳的支持物进行蛋白电泳有简便、快速、样品用量少, 应用范围

广,分离清晰,没有吸附现象等优点。目前已广泛用于血清蛋白、脂蛋白、血红蛋白、糖蛋白和、同功酶的分离及用在免疫电泳中。

### 三 器材:

1. 醋酸纤维薄膜( $2 \times 8$  厘米)。
2. 常压电泳仪。
3. 点样器(市售或自制)<sup>①</sup>。
4. 培养皿(染色及漂洗用)。
5. 粗滤纸。
6. 玻璃板。
7. 竹镊。
8. 白磁反应板。

### 四、试剂:

1. 巴比妥缓冲液(pH8.6, 离子强度 0.07) 1000毫升  
巴比妥 2.76 克, 巴比妥钠 15.45 克, 加水至 1000 毫升。

2. 染色液 300毫升  
含氨基黑 10B0.25克, 甲醇 50 毫升, 冰醋酸 10 毫升, 水 40 毫升(可重复使用)。

3. 漂洗液 2000 毫升  
含甲醇或乙醇 45 毫升, 冰醋酸 5 毫升, 水 50 毫升。

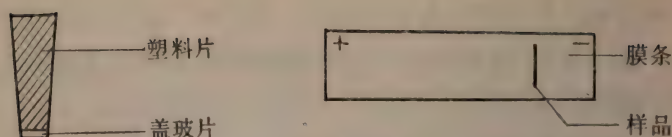
4. 透明液 300 毫升  
含无水乙醇 7 份, 冰醋酸 3 份。

### 五、操作:

1. 浸泡: 用镊子取醋酸纤维薄膜 1 张(识别出光泽面与无光泽面, 并在角上用笔做上记号)放在缓冲液中浸泡 20 分钟。
2. 点样: 把膜条从缓冲液中取出, 夹在两层粗滤纸内吸干多

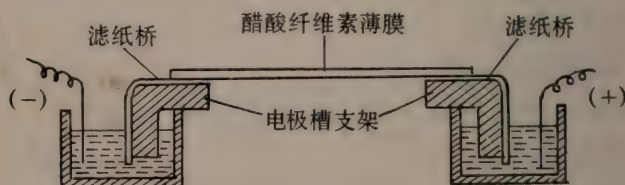
---

① 点样器可用两个塑料薄片, 中间夹一0.8 厘米宽的盖玻片用粘合剂粘合制成。



余的液体,然后平铺在玻璃板上(无光泽面朝上),将点样器先在放置于白磁反应板上的血清中沾一下,再在膜条一端 2—3 厘米处轻轻地水平地落下并随即提起,这样即在膜条上点上了细条状的血清样品。②

3. 电泳:在电泳槽内加入缓冲液,使两个电极槽内的液面等高,将膜条平悬于电泳槽支架的滤纸桥上。(先剪裁尺寸合适的滤纸条,取双层滤纸条附着在电泳槽的支架上,使它的一端与支架的前沿对齐,而另一端浸入电极槽的缓冲液内。用缓冲液将滤纸全部润湿并驱除气泡,使滤纸紧贴在支架上,即为滤纸桥(它是联系醋酸纤维薄膜和两极缓冲液之间的“桥梁”)。膜条上点样的一端靠近负极。盖严电泳室。通电。调节电压至 160V,电流强度 0.4—0.7 毫安/厘米膜宽,电泳时间约为 25 分钟。



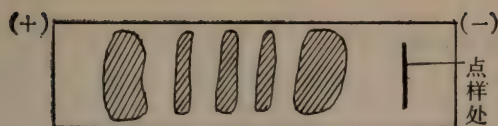
醋酸纤维素薄膜电泳装置示意图

4. 染色:电泳完毕后将膜条取下并放在染色液中浸泡 10 分钟。

5. 漂洗:将膜条从染色液中取出后移置到漂洗液中漂洗数次至无蛋白区底色脱净为止,可得色带清晰的电泳图谱。

② 点样好坏是电泳图谱是否清晰的关键,可让学生先在滤纸上练习。





醋酸纤维薄膜血清蛋白电泳图谱

从左至右,依次为:血清清蛋白  $\alpha_1$  球蛋白  $\alpha_2$  球蛋白  $\beta$  球蛋白  $\gamma$  球蛋白

定量测定时可将膜条用滤纸压平吸干,按区带分段剪开,分别浸在体积 0.4 当量/升氢氧化钠溶液中,并剪取相同大小的无色带膜条作空白对照,进行比色。或者将干燥的电泳图谱膜条放入透明液中浸泡 2—3 分钟后取出贴于洁净玻璃板上,干后即成为透明的薄膜图谱,可用光密度计直接测定。

## 实验六 酪蛋白的制备

### 一、目的:

学习从牛乳中制备酪蛋白的原理和方法。

### 二、原理:

牛乳中主要的蛋白质是酪蛋白,含量约为 35 克/升。酪蛋白是一些含磷蛋白质的混合物,等电点为 4.7。利用等电点时溶解度最低的原理,将牛乳的 pH 调至 4.7 时,酪蛋白就沉淀出来。用乙醇洗涤沉淀物,除去脂类杂质后便可得到纯的酪蛋白。

### 三、器材:

1. 离心机。
2. 抽滤装置。
3. 精密 pH 试纸或酸度计。
4. 电炉。
5. 烧杯。

6. 温度计。

#### 四、试剂与材料：

- |                              |          |
|------------------------------|----------|
| 1. 牛奶                        | 2,500 毫升 |
| 2. 95% 乙醇                    | 1,200 毫升 |
| 3. 无水乙醚                      | 1,200 毫升 |
| 4. 0.2 摩尔/升 pH 4.7 醋酸-醋酸钠缓冲液 | 3,000 毫升 |

先配制 A 液与 B 液。

A 液: 0.2 摩尔/升醋酸钠溶液

称  $\text{NaAC} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  54.44 克, 定容至 2000 毫升。

B 液: 0.2 摩尔/升醋酸溶液

称优级纯醋酸 (含量大于 99.8%) 12.0 克定容至 1,000 毫升。

取 A 液 1770 毫升, B 液 1230 毫升混合 即得 pH4.7 的醋酸-醋酸钠缓冲液 3,000 毫升。

- |             |          |
|-------------|----------|
| 5. 乙醇-乙醚混合液 | 2,000 毫升 |
|-------------|----------|

乙醇:乙醚 = 1:1 (V/V)

#### 五、操作方法:

1. 将 100 毫升牛奶加热到  $40^{\circ}\text{C}$ 。在搅拌下慢慢加入 予热到  $40^{\circ}\text{C}$ 、pH4.7 的醋酸缓冲液 100 毫升。用精密 pH 试纸或酸度计调 pH 至 4.7。

将上述悬浮液冷至室温。离心 15 分钟 (3000 转/分)。弃去清液, 得酪蛋白粗制品。

2. 用水洗沉淀三次, 离心 10 分钟 (3,000 转/分), 弃去上清液。

3. 在沉淀中加入 30 毫升乙醇, 搅拌片刻, 将全部悬浊液转移至布氏漏斗中抽滤。用乙醇-乙醚混合液洗沉淀二次。最后用乙醚洗沉淀两次, 抽干。

4. 将沉淀摊开在表面皿上, 风干; 得酪蛋白纯品。

5. 准确称重, 计算含量和得率。

含量: 酪蛋白 克/100 毫升牛乳 (克%)

$$\text{得率: } \frac{\text{测得含量}}{\text{理论含量}} \times 100\%$$

式中理论含量为 3.5 克/100 毫升牛乳。

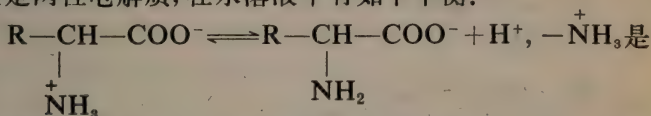
## 实验七 甲醛滴定法测定氨基氮

### 一、目的:

初步掌握甲醛滴定法测定氨基酸含量的原理和操作要点。

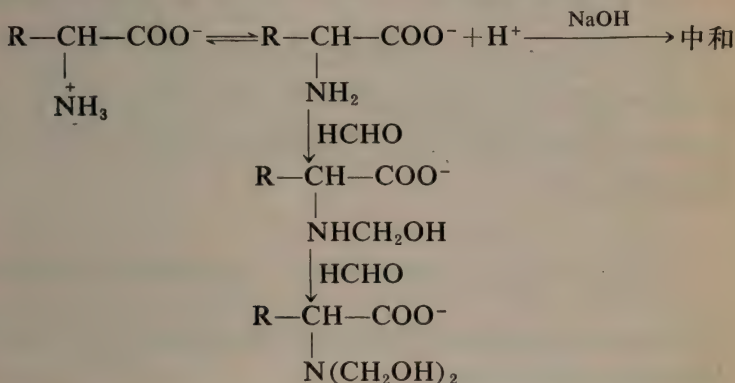
### 二、原理:

氨基酸是两性电解质, 在水溶液中有如下平衡:



弱酸, 完全解离时 pH 为 11—12 或更高, 若用碱滴定  $-\text{NH}_3^+$  所释放的  $\text{H}^+$  来测量氨基酸, 一般指示剂变色域小于 10, 很难准确指示终点。

常温下, 甲醛能迅速与氨基酸的氨基结合, 生成羟甲基化合物, 使上述平衡右移, 促使  $-\text{NH}_3^+$  释放  $\text{H}^+$ , 使溶液的酸度增加, 滴定



终点移至酚酞的变色域内(pH9.0左右)。因此,可用酚酞作指示剂,用标准氢氧化钠溶液滴定。

反应式见 121 页。

如样品为一种已知的氨基酸,从甲醛滴定的结果可算出氨基氮的含量<sup>①</sup>。如样品是多种氨基酸的混合物如蛋白水解液,则滴定结果不能作为氨基酸的定量依据。但此法简便快速,常用来测定蛋白质的水解程度,随水解程度的增加滴定值也增加,滴定值不再增加时,表示水解作用已完全。

### 三、器材:

1. 25 毫升锥形瓶。
2. 3 毫升微量滴定管。
3. 吸管。

### 四、试剂:

- |                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| 1. 0.1 当量/升标准甘氨酸溶液               | 300 毫升 |
| 准确称取 750 毫克甘氨酸,溶解后定容至 100 毫升。    |        |
| 2. 0.1 当量/升标准氢氧化钠溶液 <sup>②</sup> | 500 毫升 |
| 3. 酚酞指示剂                         | 20 毫升  |
| 0.5% 酚酞的 50% 乙醇溶液                |        |
| 4. 中性甲醛溶液                        | 400 毫升 |

在 50 毫升 36—37% 分析纯甲醛溶液中加入 1 毫升 0.1% 酚酞乙醇水溶液,用 0.1 当量/升的氢氧化钠溶液滴定到微红,贮于密闭的玻璃瓶中,此试剂在临用前配制。如已放置一段时间,则使用前需重新中和。

---

① 脯氨酸与甲醛作用生成不稳定的化合物,使滴定毫升数偏低。酪氨酸的毫升数结果偏高。

② 标准氢氧化钠溶液应在使用前标定,并在密闭瓶中保存。不可使用隔日贮在微量滴定管中的剩余氢氧化钠。



## 五、操作方法:

1. 取 3 个 25 毫升的锥形瓶, 编号。向第 1、2 号瓶内各加入 0.1 当量/升的标准甘氨酸溶液 2 毫升和水 5 毫升, 混匀。向 3 号瓶内加入 7 毫升水。然后向三个瓶中各加入 5 滴酚酞指示剂, 混匀后各加 2 毫升甲醛溶液再混匀, 分别用 0.1 当量/升标准氢氧化钠溶液滴定至溶液显微红色。

重复以上实验 2 次, 记录每次每瓶消耗标准氢氧化钠溶液的毫升数。取平均值, 计算甘氨酸氨基氮的回收率。

$$\text{甘氨酸氨基氮回收率}\% = \frac{\text{实际测得量}}{\text{加入理论量}} \times 100$$

公式中实际测得量为滴定第 1—2 号瓶耗用的标准氢氧化钠溶液毫升数的平均值与第 3 号瓶耗用的标准氢氧化钠溶液毫升数之差乘以标准氢氧化钠的当量浓度, 再乘以 14.008。

2 毫升乘以标准甘氨酸的当量浓度再乘以 75。即为加入理论量的毫克数。

2. 取未知浓度的甘氨酸溶液 2 毫升, 依上述方法进行测定, 平行做几份, 取平均值。计算每毫升甘氨酸溶液中含有氨基氮的毫克数。

$$\text{氨基氮(毫克/毫升)} = \frac{(\bar{V}_{\text{未}} - \bar{V}_{\text{对}}) \times N_{\text{NaOH}} \times 14.008}{2}$$

公式中  $\bar{V}_{\text{未}}$  为滴定待测液耗用标准氢氧化钠溶液的平均毫升数。 $\bar{V}_{\text{对}}$  为滴定对照液 (3 号瓶) 耗用标准氢氧化钠溶液的平均毫升数。 $N_{\text{NaOH}}$  为标准氢氧化钠溶液的真实当量浓度。<sup>①</sup>

---

① 本实验为定量实验, 甘氨酸和氢氧化钠的浓度要严格标定, 加量要准确, 全部操作要按分析化学要求进行。

## 第十章 核酸的化学

### 实验八 酵母核糖核酸的分离及组分鉴定

#### 一、目的:

了解核酸的组分,并掌握鉴定核酸组分的方法。

#### 二、原理:

酵母核酸中 RNA 含量较多。RNA 可溶于碱性溶液,在碱提取液中加入酸性乙醇溶液可以使解聚的核糖核酸沉淀,由此即得到 RNA 的粗制品。

核糖核酸含有核糖、嘌呤碱,嘧啶碱和磷酸各组分。加硫酸煮沸可使其水解,从水解液中可以测出上述组分的存在。

#### 三、器材:

1. 乳钵。
2. 150 毫升锥形瓶。
3. 水浴。
4. 量筒。
5. 布氏漏斗及抽滤瓶。
6. 吸管。
7. 滴管。
8. 试管及试管架。
9. 烧杯。
10. 离心机。

## 11. 漏斗。

### 四、试剂和材料:

1. 0.04 摩尔/升 氢氧化钠溶液 1,000 毫升

2. 酸性乙醇溶液 500 毫升

将 0.3 毫升浓盐酸加入 30 毫升乙醇中。

3. 95% 乙醇 1,000 毫升

4. 乙醚 500 毫升

5. 3 当量/升硫酸 200 毫升

6. 浓氨水 50 毫升

7. 0.1 摩尔/升硝酸银溶液 50 毫升

8. 三氯化铁浓盐酸溶液 80 毫升

将 2 毫升 10% 三氯化铁溶液 (用  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  配制) 加入到 400 毫升浓盐酸中。

9. 苔黑酚乙醇溶液 10 毫升

溶解 6 克苔黑酚于 100 毫升 95% 乙醇中 (可在冰箱中保存 1 个月)。

10. 定磷试剂 50 毫升

(1) 17% 硫酸: 将 17 毫升浓硫酸 (比重 1.84) 缓缓加入到 83 毫升水中。

(2) 2.5% 钼酸铵溶液: 2.5 克钼酸铵溶于 100 毫升水中。

(3) 10% 抗坏血酸溶液: 10 克抗坏血酸溶于 100 毫升水中, 贮棕色瓶保存。溶液呈淡黄色时可用, 如呈深黄或棕色则失效, 需纯化抗坏血酸。

临用时将上述三种溶液与水按如下比例混合。

17% 硫酸: 2.5% 钼酸铵溶液: 10% 抗坏血酸溶液: 水 = 1:1:1:2(V/V)。

11. 酵母粉 200 克

## 五、操作方法<sup>①</sup>:

将 15 克酵母悬浮于 90 毫升 0.04 摩尔/升氢氧化钠溶液中,并在乳钵中研磨均匀。将悬浮液转移至 150 毫升锥形瓶中。在沸水浴上加热 30 分钟后,冷却。离心(3,000 转/分)15 分钟将上清液缓缓倾入 30 毫升酸性乙醇溶液中。注意要一边搅拌一边缓缓倾入。待核糖核酸沉淀完全后,离心(3,000 转/分)3 分钟。弃去清液。用 95% 乙醇洗涤沉淀两次,乙醚洗涤沉淀一次后,再用乙醚将沉淀转移至布氏漏斗中抽滤。沉淀可在空气中干燥。

取 200 克提取的核酸,加入 3 当量/升硫酸 10 毫升,在沸水浴中加热 10 分钟制成水解液并进行组分的鉴定。

1. 嘌呤碱:取水解液 1 毫升加入过量浓氨水,然后加入约 1 毫升 0.1 摩尔/升硝酸银溶液,观察有无嘌呤碱的银化合物沉淀。

2. 核糖:取一支试管加入水解液 1 毫升、三氯化铁浓盐酸溶液 2 毫升和苔黑酚乙醇溶液 0.2 毫升。放沸水浴中 10 分钟。注意溶液是否变成绿色,说明核糖的存在。

3. 磷酸:取一支试管,加入水解液 1 毫升和定磷试剂 1 毫升。在水浴中加热,观察溶液是否变成蓝色,说明磷酸是否存在。

## 实验九 菜花(花椰菜)中核 酸的分离和鉴定

### 一、目的:

初步掌握从菜花中分离核酸的方法,和 RNA、DNA 的定性检定。

---

① 从酵母中提取核酸部分可由两个学生共做一份。水解及组分鉴定部分由每个学生独立操作。

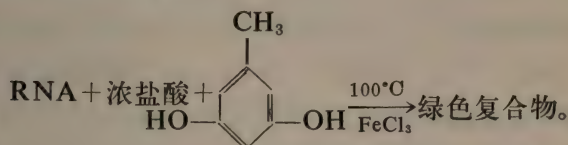


## 二、原理:

用冰冷的稀三氯乙酸或稀高氯酸溶液在低温下抽提菜花匀浆,以除去酸溶性小分子物质;再用有机溶剂,如乙醇、乙醚等抽提,去掉脂溶性的磷脂等物质。最后用浓盐溶液(10%氯化钠溶液)和0.5当量/升高氯酸(70°C)分别提取DNA和RNA,再进行定性检定。

由于核糖和脱氧核糖有特殊的颜色反应,经显色后所呈现的颜色深浅在一定范围内和样品中所含的核糖和脱氧核糖的量成正比,因此可用定糖法来定性定量测定核酸。

1. 核糖的测定:测定核糖的常用方法是苔黑酚(即3,5-二羟甲苯)法(Orcinol反应)。当含有核糖的RNA与浓盐酸及3,5-二羟甲苯在沸水浴中加热10—20分钟后,有绿色物产生,这是因为RNA脱嘌呤后的核糖与酸作用生成糠醛,后者再与3,5-二羟甲苯作用产生绿色物质。



DNA、蛋白质和粘多糖等物质对测定有干扰作用。

2. 脱氧核糖的测定:测定脱氧核糖的常用方法是二苯胺法。含有脱氧核糖的DNA在酸性条件下和二苯胺在沸水浴中共热10分钟后,产生蓝色。这是因为DNA嘌呤核苷酸上的脱氧核糖遇酸生成ω-羟基-6-酮基戊醛,它再和二苯胺作用产生蓝色物质。

冰醋酸



此法易受多种糖类及其衍生物和蛋白质的干扰。

上述两种定糖的方法准确性较差,但快速简便,能鉴别 DNA 与 RNA,是检定核酸,核苷酸的常用方法。

### 三、器材:

1. 恒温水浴。
2. 电炉。
3. 离心机。
4. 布氏漏斗装置。
5. 吸管。
6. 烧杯。
7. 量筒。
8. 剪刀。

### 四、试剂和材料:

1. 新鲜菜花。
2. 95%乙醇 600 毫升
3. 丙酮 400 毫升
4. 5%高氯酸溶液 200 毫升
5. 0.5 当量/升高氯酸溶液 200 毫升
6. 10%氯化钠溶液 400 毫升
7. 标准 RNA 溶液(5 毫克/100 毫升) 50 毫升
8. 标准 DNA 溶液(15毫克/100 毫升) 50 毫升
9. 粗氯化钠 250 克
10. 海砂 5 克
11. 二苯胺试剂 60 毫升

将 1 克二苯胺溶于 100 毫升冰醋酸中,再加入 2.75 毫升浓硫酸(置冰箱中可保存 6 个月。使用前,在室温下摇匀)。

12. 三氯化铁浓盐酸溶液 25 毫升

配法见实验八。

### 13. 苔黑酚乙醇溶液

200 毫升

配法见实验八。

## 五、操作步骤:

### 1. 核酸的分离。<sup>①</sup>

(1) 取菜花的花冠 20 克, 剪碎后置于研钵中。加入 20 毫升 95% 乙醇和 400 毫克海沙, 研磨成匀浆。然后用布氏漏斗抽滤, 弃去滤液。

(2) 滤渣中加入 20 毫升丙酮, 搅拌均匀, 抽滤, 弃去滤液。

(3) 再向滤渣中加入 20 毫升丙酮, 搅拌 5 分钟后抽干(用力压滤渣, 尽量除去丙酮)。

(4) 在冰盐浴中, 将滤渣悬浮在预冷的 20 毫升 5% 高氯酸溶液中。搅拌, 抽滤, 弃去滤液。

(5) 将滤渣悬浮于 20 毫升 95% 乙醇中, 抽滤, 弃去滤液。

(6) 滤渣中加入 20 毫升丙酮, 搅拌 5 分钟。抽滤至干, 用力压滤渣尽量除去丙酮。

(7) 将干燥的滤渣重新悬浮在 40 毫升 10% 氯化钠溶液中。在沸水浴中加热 15 分钟。放置, 冷却, 抽滤至干, 留滤液。并将此操作重复进行一次。将两次滤液合并, 为提取物一。

(8) 将滤渣重新悬浮在 20 毫升 0.5 当量/升高氯酸溶液中。加热到 70°C。保温 20 分钟(恒温水浴)后抽滤。留滤液(提取物二)。

### 2. RNA, DNA 的定性检定:

#### (1) 二苯胺反应:

---

① 两个学生为一组, 做核酸的提取实验。

管 号	1	2	3	4	5
蒸馏水(毫升)	1	—	—	—	—
DNA 溶液(毫升)	—	1	—	—	—
RNA 溶液(毫升)	—	—	1	—	—
提取物一(毫升)	—	—	—	1	—
提取物二(毫升)	—	—	—	—	1
二苯胺试剂(毫升)	2	2	2	2	2
放沸水浴中10分钟后的现象					

## (2) 苔黑酚反应:

管 号	1	2	3	4	5
蒸馏水(毫升)	1	—	—	—	—
DNA 溶液(毫升)	—	1	—	—	—
RNA 溶液(毫升)	—	—	1	—	—
提取物一(毫升)	—	—	—	1	—
提取物二(毫升)	—	—	—	—	1
三氯化铁浓盐酸溶液(毫升)	2	2	2	2	2
苔黑酚乙醇溶液(毫升)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
放沸水浴中10—20分钟后的现象					

根据现象分析提取物一和提取物二主要含有什么物质?

## 实验十 醋酸纤维薄膜电泳分离核苷酸

### 一、目的:

学习核糖核酸碱水解的原理和方法掌握核糖核苷酸的醋酸纤维薄膜电泳的原理和方法。



## 二、原理:

RNA 在稀碱条件下水解, 先形成中间物 2', 3'-环状核苷酸, 进一步水解得到 2' 和 3'-核苷酸的混合物。

在 pH3.5 时, 各核苷酸的第一磷酸基 ( $pK0.7-1.0$ ) 完全解离, 第二磷酸基 ( $pK6.0$ ) 和烯醇基 ( $pK9.5$  以上) 不解离, 而含氮环的解离程度差别很大。(见附表) 因此在 pH3.5 条件下进行电泳可将这四种核苷酸分开。

四种核苷酸在 pH3.5 时的离子化程度

核 苷 酸	含氮环的 $pK$ 值	离子化程度	净负电荷
AMP	3.70	0.54	0.46
GMP	2.30	0.05	0.95
CMP	4.24	0.84	0.16
UMP	—		1.00

本实验先用稀氢氧化钾溶液将 RNA 水解, 再加高氯酸将水解液调至 pH3.5, 同时生成高氯酸钾沉淀以除去  $K^+$ , 然后用电泳法分离水解液中各核苷酸, 并在紫外分析灯下确定 RNA 碱水解液电泳图谱。

## 三、器材:

1. 电热恒温水浴。
2. 紫外分析灯(波长为 254nm)。
3. 点样器。
4. 电泳仪。电泳槽。
5. 离心机。

## 四、试剂和材料:

1. 0.3 摩尔/升氢氧化钾溶液 100毫升
2. 200 克/升高氯酸溶液 40 毫升
3. 核糖核酸(粉末) 4 克

4. 0.02 摩尔/升 pH3.5 柠檬酸缓冲液

1000 毫升

5. 醋酸纤维薄膜(2×8 厘米)

### 五、操作方法:

#### 1. RNA 的碱水解:

称取 0.2 克 RNA, 溶于 5 毫升 0.3 摩尔/升氢氧化钾溶液中, 使 RNA 的浓度达到 20—30 毫克/毫升。在 37°C 下保温 18 小时(或沸水浴 30 分钟)。然后将水解液转移到锥形瓶内。在冰浴中用高氯酸溶液滴定到水解液的 pH 为 3.5。2000 转/分离心 10 分钟。除去沉淀, 上清液即为样品液。

#### 2. 点样:

将醋酸纤维素薄膜在 pH3.5, 0.02 摩尔/升柠檬酸缓冲液中浸湿后, 用滤试吸去多余的缓冲液。然后将膜条无光泽面向上平铺在玻璃板上, 用点样器在距膜条一端 2—3 厘米处点样。

#### 3. 电泳:

将点好样品的薄膜小心地放入电泳槽内, 注意点样的一端应靠近负极。调节电压至 160V, 电流强度为 0.4 毫安/厘米。电泳 25 分钟。

电泳后, 将膜条放在滤纸上, 于紫外分析灯下观察, 用铅笔将吸收紫外光的暗斑圈出。在记录本上绘出 RNA 水解液的醋酸纤维薄膜电泳图谱, 并根据附表中的数据分析确定各斑点代表哪种核苷酸。

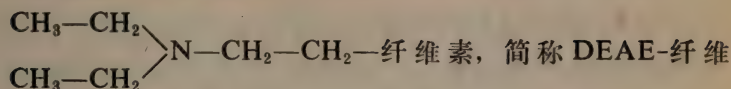
## 实验十一 薄层层析法分离 AMP、ADP 和 ATP

### 一、目的:

1. 学习薄层层析法的基本原理及操作方法。
2. 应用 DEAE-纤维素薄层层析分离鉴定核苷酸。

## 二、原理:

二乙氨基乙基纤维素:



素,是弱碱性阴离子交换剂,在 pH3.5 左右  $\bigg\rangle \text{N}$ —解离成  $\begin{array}{c} \text{Cl}^- \\ \bigg\rangle \text{N}^+ - \\ | \\ \text{H} \end{array}$

季胺型,带负电荷的核苷酸离子可被交换上去。利用各种核苷酸的结构不同,因而和 DEAE-纤维素亲和力的大小不同,来达到分离的目的。

## 三、器材:

1. 玻璃板: 4.5 厘米  $\times$  20 厘米。
2. 布氏漏斗或离心机。
3. 涂布器<sup>①</sup> (薄层厚度: 0.6 毫米)。
4. 毛细管。
5. 吹风机。
6. 恒温箱。
7. 托盘天平。
8. 紫外分析灯 (波长 254 毫微米)。

## 四、试剂:

- |   |         |
|---|---------|
| 1. 1 当量/升盐酸溶液   | 200 毫升  |
| 2. pH3.5 0.05 摩尔/升柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液   | 1000 毫升 |
| 称取柠檬酸 $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 16.20 克, 柠檬酸钠 $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 6.70 克, 溶解在 2,000 毫升水中, 调 pH 至 3.5。 |         |
| 3. 标准核苷酸  | 各 5 毫升  |

① 涂布器可以用有机玻璃自制: 用有机玻璃粘成长方形框, 其中一面与底面有空隙, 空隙大小决定薄层的厚度。本实验薄层厚度为 0.6 毫米。

10 毫克/毫升的 AMP、ADP 和 ATP 溶液

4. 混合核苷酸

5 毫升

AMP + ADP + ATP (均为 10 毫克/毫升)

5. DEAE-纤维素

40 克

### 五、操作方法:

#### 1. DEAE-纤维素的预处理:

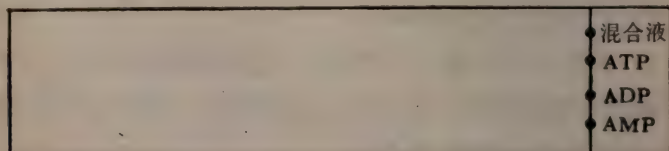
用 4 倍体积的水将 DEAE-纤维素浸泡过夜, 离心或抽干。再用 1 当量/升的盐酸溶液浸泡 4 小时(或搅拌 1.5 小时)。用水洗至中性或在 60°C 以下烘干备用。

#### 2. 铺板: ①

用水把经过予处理的 DEAE-纤维素在烧杯里调成糊状, 立即倒入干净的玻璃板上。轻轻摇动玻璃板, 使纤维素铺成均匀的薄层; 或将糊状物倒至涂布器的槽内, 用涂布器将纤维素涂成薄层(厚 0.6 毫米)。将玻璃板先放在水平桌面上静置片刻, 再放入 60°C 烘箱内烘干备用。涂布器的制作及铺板方法参见第三章图 3-11。

#### 3. 点样:

在距 DEAE-纤维素板一端 2 厘米处用铅笔轻轻划一横线, 在横线中央用毛细管点样(见图)。每次点样后, 用冷风吹干, 每种样品点 2—3 次。



#### 4. 展层:

---

① 每个学生用 1 克予处理过的 DEAE-纤维素, 加水 8—9 毫升, 可铺 4.5 厘米 × 20 厘米的板二块。



在 250 毫升烧杯内倒进约 1 厘米深的 pH3.5 的柠檬酸缓冲液 (约 30 毫升)。把点过样的薄板倾斜插入此烧杯内 (点样端在下) 溶液由下而上流动, 当溶剂前沿到达距薄板上端约 1 厘米处时 (25 分钟左右), 取出薄板, 用热风吹干, 用波长 254 毫微米的紫外灯照射 DEAE-纤维素薄层, 核苷酸斑点为暗区。DEAE-纤维素可回收, 经再处理可反复使用。①

此法具有快速灵敏的特点。

---

① 再处理方法: 将 DEAE-纤维素从玻璃板上刮下, 用水洗后, 在 1 当量/升的氢氧化钠溶液中浸泡 2 小时, 用水洗至中性 (或水的 pH), 再用 1 当量/升的盐酸溶液浸泡 2 小时。再用水洗至中性或在 60°C 烘箱中烘干备用。学生从铺板开始做实验, 2.5—3 小时可全部完成。DEAE-纤维素的予处理和再处理均由教师完成。

# 第十一章 酶

## 实验十二 酶 的 特 性

### 一、目的:

加深对酶的性质认识。

### 二、内容:

本实验由温度对酶活力的影响; pH 对酶活力的影响; 酶的激活剂及抑制剂; 酶的专一性四组实验组成。

#### (一) 温度对酶活力的影响

##### 1. 原理:

酶的催化作用受温度的影响, 在最适温度下, 酶的反应速度最高。大多数动物酶的最适温度为  $37-40^{\circ}\text{C}$ , 植物酶的最适温度为  $50-60^{\circ}\text{C}$ 。

酶对温度的稳定性与其存在形式有关。有些酶的干燥制剂, 虽加热到  $100^{\circ}\text{C}$ , 其活性并无明显改变, 但在  $100^{\circ}\text{C}$  的溶液中却很快地完全失去活性。

低温能降低或抑制酶的活性, 但不能使酶失活。

##### 2. 器材:

- (1) 试管及试管架。
- (2) 恒温水浴。
- (3) 冰浴。
- (4) 沸水浴。

### 3. 试剂和材料:

(1) 0.2% 淀粉的 0.3% 氯化钠溶液 150 毫升  
需新鲜配制。

(2) 稀释 200 倍的唾液 50 毫升

用蒸馏水漱口,以清除食物残渣,再含一口蒸馏水,半分钟后使其流入量筒并稀释 200 倍,(稀释倍数可根据各人唾液淀粉酶活性调整)混匀备用。

(3) 碘化钾-碘溶液 50 毫升  
将碘化钾 20 克及碘 10 克溶于 100 毫升水中。使用前稀释 10 倍。

### 4. 操作方法:

淀粉和可溶性淀粉遇碘呈蓝色。糊精按其分子的大小,遇碘可呈蓝色、紫色、暗褐色或红色。最简单的糊精遇碘不呈颜色,麦芽糖遇碘也不呈色。在不同温度下,淀粉被唾液淀粉酶水解的程度,可由水解混合物遇碘呈现的颜色来判断。

取 3 支试管,编号后按下表加入试剂:

管 号	1	2	3
淀粉溶液(毫升)	1.5	1.5	1.5
稀释唾液(毫升)	1	1	—
煮沸过的稀释唾液(毫升)	—	—	1

摇匀后,将 1 号、3 号两试管放入 37°C 恒温水浴中,2 号试管放入冰水中。10 分钟后取出,(将 2 号管内液体分为两半)用碘化钾-碘溶液来检验 1、2、3 管内淀粉被唾液淀粉酶水解的程度。记录并解释结果,将二号管剩下的一半溶液放入 37°C 水浴中继续保温 10 分钟后,再用碘液实验,结果如何?

## (二) pH对酶活性的影响

### 1. 原理:

酶的活力受环境 pH 的影响极为显著。不同酶的最适 pH 值不同。本实验观察 pH 对唾液淀粉酶活性的影响, 唾液淀粉酶的最适 pH 约为 6.8。

### 2. 器材:

(1) 试管及试管架。

(2) 吸管。

(3) 滴管。

(4) 50 毫升锥形瓶。

(5) 恒温水浴。

### 3. 试剂和材料:

(1) 新配制的溶于 0.3% 氯化钠的 0.5% 淀粉溶液 250 毫升

(2) 稀释 200 倍的新鲜唾液 100 毫升

(3) 0.2 摩尔/升磷酸氢二钠溶液 600 毫升

(4) 0.1 摩尔/升柠檬酸溶液 400 毫升

(5) 碘化钾-碘溶液 50 毫升

(6) pH 试纸: pH=5、pH=5.8、pH=6.8、pH=8 四种

### 4. 操作方法:

取 4 个标有号码的 50 毫升锥形瓶。用吸管按下表添加 0.2

锥形瓶号码	0.2 摩尔/升磷酸氢二钠 (毫升)	0.1 摩尔/升柠檬酸 (毫升)	pH
1	5.15	4.85	5.0
2	6.05	3.95	5.8
3	7.72	2.28	6.8
4	9.72	0.28	8.0



摩尔/升磷酸氢二钠溶液和 0.1 摩尔/升柠檬酸溶液以制备 pH5.0—8.0 的四种缓冲液。

从四个锥形瓶中各取缓冲液 3 毫升，分别注入 4 支带有号码的试管中，随后于每个试管中添加 0.5% 淀粉溶液 2 毫升和稀释 200 倍的唾液 2 毫升。向各试管中加入稀释唾液的时间间隔各为 1 分钟。将各试管内容物混匀，并依次置于 37°C 恒温水浴中保温。

第四管加入唾液 2 分钟后，每隔 1 分钟由第 3 管取出一滴混合液，置于白瓷板上，加 1 小滴碘化钾-碘溶液，检验淀粉的水解程度。待混合液变为棕黄色时，向所有试管依次添加 1—2 滴碘化钾-碘溶液。添加碘化钾-碘溶液的时间间隔，从第一管起，亦均为 1 分钟。

观察各试管内容物呈现的颜色，分析 pH 对唾液淀粉酶活性的影响。

### (三) 唾液淀粉酶的活化和抑制

#### 1. 原理：

酶的活性受活化剂或抑制剂的影响。氯离子为唾液淀粉酶的活化剂，铜离子为其抑制剂。

#### 2. 器材：

(1) 恒温水浴。

(2) 试管及试管架。

#### 3. 试剂和材料：

(1) 0.1% 淀粉溶液 150 毫升

(2) 稀释 200 倍的新鲜唾液 150 毫升

(3) 1% 氯化钠溶液 50 毫升

(4) 1% 硫酸铜溶液 50 毫升

(5) 1% 硫酸钠溶液 50 毫升

## (6) 碘化钾-碘溶液

100毫升

### 4. 操作方法:

管 号	1	2	3	4
0.1%淀粉溶液(毫升)	1.5	1.5	1.5	1.5
稀释唾液(毫升)	0.5	0.5	0.5	0.5
1%硫酸铜溶液(毫升)	0.5	—	—	—
1%氯化钠溶液(毫升)	—	0.5	—	—
1%硫酸钠溶液(毫升)	—	—	0.5	—
蒸馏水(毫升)	—	—	—	0.5
37°C恒温水浴、保温 10 分钟 <sup>注</sup>				
碘化钾-碘溶液(滴)	2—3	2—3	2—3	2—3
现 象				

注 保温时间可根据各人唾液淀粉酶活力调整。

解释结果,说明本实验第3管的意义。

## (四) 酶的专一性

### 1. 原理:

酶具有高度的专一性。本实验以唾液淀粉酶和蔗糖酶对淀粉和蔗糖的作用为例,来说明酶的专一性。

淀粉和蔗糖无还原性,唾液淀粉酶水解淀粉生成有还原性的麦芽糖,但不能催化蔗糖的水解。蔗糖酶能催化蔗糖水解产生还原性葡萄糖和果糖,但不能催化淀粉的水解。用 Benedict 试剂检查糖的还原性。

### 2. 器材:

(1) 恒温水浴。 (2) 沸水浴。 (3) 试管及试管架。

### 3. 试剂和材料:

(1) 2% 蔗糖溶液 150 毫升

(2) 溶于 0.3% 氯化钠的 1% 淀粉溶液 150 毫升  
(需新鲜配制)

(3) 稀释 200 倍的新鲜唾液 100 毫升

(4) 蔗糖酶溶液 100 毫升

将啤酒厂的鲜酵母用水洗涤 2—3 次(离心法), 然后放在滤纸上自然干燥。取干酵母 100 克, 置于乳钵内, 添加适量蒸馏水及少量细沙, 用力研磨, 提取约 1 小时, 再加蒸馏水使总体积约为原体积的 10 倍。离心, 将上清液保存于冰箱中备用。

(5) Benedict 氏试剂 200 毫升

无水硫酸铜 1.74 克溶于 100 毫升热水中, 冷却后稀释至 150 毫升。取柠檬酸钠 173 克, 无水碳酸钠 100 克和 600 毫升水共热, 溶解后冷却并加水至 850 毫升。再将冷却的 150 毫升硫酸铜溶液倾入。本试剂可长久保存。

#### 4. 操作方法:

##### (1) 淀粉酶的专一性:

管 号	1	2	3	4	5	6
1% 淀粉溶液(滴)	4	—	4	—	4	—
2% 蔗糖溶液(滴)	—	4	—	4	—	4
稀释唾液(毫升)	—	—	1	1	—	—
煮沸过的稀释唾液(毫升)	—	—	—	—	1	1
蒸馏水(毫升)	1	1	—	—	—	—
37°C 恒温水浴 15 分钟						
Benedict 试剂(毫升)	1	1	1	1	1	1
沸 水 浴 2—3 分 钟						
现 象						

解释实验结果(提示:唾液除含淀粉酶外还含有少量麦芽糖酶)。

## (2) 蔗糖酶的专一性:

管 号	1	2	3	4	5	6
1% 淀粉 (滴)	4	—	4	—	4	—
2% 蔗糖溶液(滴)	—	4	—	4	—	4
蔗糖酶溶液(毫升)	—	—	1	1	—	—
煮沸过的蔗糖酶溶液(毫升)	—	—	—	—	1	1
蒸馏水(毫升)	1	1	—	—	—	—
37°C 恒 温 水 浴 5 分 钟						
Benedict 氏试剂(毫升)	1	1	1	1	1	1
沸 水 浴 2—3 分 钟						
现 象						

解释实验结果。

## 实验十三 枯草杆菌蛋白酶活力测定

### 一、目的:

1. 学习测定蛋白酶活力的方法。
2. 掌握 72 型或 721 型分光光度计的原理和使用方法。
3. 学习绘制标准曲线的方法。

### 二、原理:

酚试剂又名 Folin 试剂,是磷钨酸和磷钼酸的混合物,它在碱性条件下极不稳定,可被酚类化合物还原产生蓝色(钼蓝和钨蓝的混合物)。

酪蛋白经蛋白酶作用后产生的酪氨酸可与酚试剂反应,所生



成的蓝色化合物可用分光光度法测定。

### 三、器材:

1. 试管及试管架。
2. 吸管。
3. 漏斗。
4. 恒温水浴。
5. 72 型(或 721 型)分光光度计。

### 四、试剂:

1. 酚试剂 400 毫升

于 2,000 毫升磨口迴流装置内加入钨酸钠 ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 100 克, 钼酸钠 ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 25 克, 水 700 毫升, 85% 磷酸 50 毫升, 浓盐酸 100 毫升。微火迴流 10 小时后加入硫酸锂 150 克, 蒸馏水 50 毫升和溴数滴摇匀。煮沸约 15 分钟, 以驱逐残溴, 溶液呈黄色。冷却后定容到 1,000 毫升。过滤, 置于棕色瓶中保存。使用前用氢氧化钠标定, 加水稀释至 1 当量/升(约加 1 倍水)。

2. 0.55 摩尔/升 碳酸钠溶液 2,000 毫升

3. 10% 三氯乙酸溶液 150 毫升

4. 0.5% 酪蛋白溶液 100 毫升

称取酪蛋白 2.5 克, 用 0.5 当量/升的氢氧化钠溶液 4 毫升润湿, 加 0.02 摩尔/升 pH7.5 磷酸缓冲液少许, 在水浴中加热溶解。冷却后, 用上述缓冲液定容至 500 毫升。此试剂临用时配制。

5. 0.02 摩尔/升 pH7.5 磷酸缓冲液。 200 毫升

称取磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 71.64 克, 用水定容至 1,000 毫升为 A 液。称取磷酸二氢钠 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 31.21 克, 用水定容至 1,000 毫升为 B 液。取 A 液 840 毫升, B 液 160 毫升, 混合后即成 0.2 摩尔/升 (pH 7.5) 磷酸缓冲液。临用时稀释 10 倍。

6. 100 微克/毫升 酪氨酸溶液 200 毫升

精确称取烘干的酪氨酸 100 毫克, 用 0.2 当量/升盐酸溶液溶解, 定容至 100 毫升, 临用时用水稀释 10 倍, 再分别配制成几种 10—60 微克/毫升浓度的酪氨酸溶液。

## 7. 酶液 100 毫升

称取 1 克枯草杆菌蛋白酶的酶粉, 用少量 0.02 摩尔/升 pH 7.5 的磷酸缓冲液溶解, 然后用同一缓冲液定容至 100 毫升。振摇约 15 分钟, 使其充分溶解, 然后用干纱布过滤。吸取滤液 5 毫升, 稀释至适当倍数(如 20 倍, 30 倍, 40 倍)供测定用。①

此酶液可在冰箱中保存一周。

## 五、操作方法: ②

### 1. 绘制标准曲线:

取不同浓度(10—60 微克/毫升)酪氨酸溶液各 1 毫升, 分别加入 0.55 摩尔/升碳酸钠溶液 5 毫升, 酚试剂 1 毫升。置 30°C 恒温水浴中显色 15 分钟, 用分光光度计在 680 毫微米处测光吸收值, 用空白管(只加水、碳酸钠溶液和酚试剂)作对照, 以光吸收值为纵坐标, 以酪氨酸的微克数为横坐标, 绘制标准曲线。

### 2. 酶活力测定:

吸取 0.5% 酪蛋白溶液 2 毫升置于试管中, 在 30°C 水浴中予热五分钟后加入予热(30°C, 5 分钟)的酶液 1 毫升, 立即计时。反应 10 分钟后, 由水浴取出, 并立即加入 10% 三氯乙酸溶液 3 毫升, 放置 15 分钟后, 用滤纸过滤。

同时另作一对对照管, 即取酶液 1 毫升先加入 3 毫升 10% 的三氯乙酸溶液, 然后再加入 0.5% 酪蛋白溶液 2 毫升, 30°C 保温 10 分钟, 放置 15 分钟, 过滤。

---

① 一般将 1 克酶粉稀释 2,000 倍, 若酶活力很高, 可酌情再稀释。

② 本实验分两次完成, 第一次绘制标准曲线, 第二次测酶活力。酶液的提取及稀释由教师课前准备好。

取 3 支试管, 编号。分别加入样品滤液、对照滤液和水各 1 毫升。然后各加入 0.55 摩尔/升的碳酸钠溶液 5 毫升, 混匀后再各加入酚试剂 1 毫升。立即混匀, 在 30°C 显色 15 分钟。以加水的一管作空白, 在 680 毫微米处测对照及样品的光吸收值。

计算酶活力:

规定在 30°C、pH7.5 的条件下, 水解酪蛋白每分钟产生酪氨酸 1 微克为一个酶活力单位。

则 1 克枯草杆菌蛋白酶在 30°C, pH7.5 的条件下所具有的活力单位为:

$$(A_{\text{样}} - A_{\text{对}}) \cdot K \cdot \frac{V}{t} \cdot N$$

式中:  $A_{\text{样}}$ : 样品液光吸收值。

$A_{\text{对}}$ : 对照液光吸收值。

$K$ : 标准曲线上光吸收为 1 时的酪氨酸微克数。

$t$ : 酶促反应的时间(分), 本实验  $t = 10$ 。

$\bar{V}$  酶促反应管的总体积, (毫升数), 本实验  $\bar{V} = 6$ 。

$N$ : 酶液的稀释倍数, 本实验  $N = 2,000$ 。

## 实验十四 底物浓度对酶促反应速度的影响 ——米氏常数的测定

### 一、目的:

1. 了解底物浓度对酶促反应速度的影响。
2. 学习测定米氏常数( $K_m$ )的原理和方法。

### 二、原理:

早在 1913 年 Michaelis 和 Menten 首先提出了酶促反应速度和底物浓度的关系式。即米氏方程式:

$$v = \frac{V[S]}{K_m + [S]}$$

式中:  $v$  为反应初速度,  $V$  为最大反应速度,  $[S]$  为底物浓度,  $K_m$  为米氏常数, 其单位为摩尔浓度。

$K_m$  值是酶的一个特征性常数, 一般说来,  $K_m$  可以近似地表示酶与底物的亲合力。测定  $K_m$  值是酶学研究中的一个重要方法。

Lineweaver-Burk 作图法是用实验方法测定  $K_m$  值的最常用的比较方便的方法。

Lineweaver 和 Burk 将米氏方程改写成倒数形式:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V}$$

实验时选择不同的  $[S]$ , 测定相对应的  $v$ 。求出两者的倒数, 以  $\frac{1}{v}$  对  $\frac{1}{[S]}$  作图, 则得到一个斜率为  $K_m/V$  的直线。将直线外推与横轴相交, 其横轴截矩为  $-\frac{1}{[S]} = -\frac{1}{K_m}$ , 由此求出  $K_m$  值。这个方法比较简便。

本实验以胰蛋白酶消化酪蛋白为例, 采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法测定  $K_m$  值。

胰蛋白酶是胰液中的一个酶, 它催化蛋白质中碱性氨基酸(L-精氨酸和 L-赖氨酸)的羧基所形成的肽键水解。水解时生成自由氨基, 因此可以用甲醛滴定法<sup>①</sup>判断自由氨基增加的数量来追踪反应。

### 三、器材

1. 50 毫升及 150 毫升锥形瓶。
2. 25 毫升碱滴定管, 滴定台、蝴蝶夹。
3. 10 毫升及 5 毫升吸管。

<sup>①</sup> 甲醛滴定法原理参见本书第九章实验七。



4. 100 毫升量筒。

5. 恒温水浴

#### 四、试剂和材料:

1. 40 克/升酪蛋白溶液(pH8.5) 10,000 毫升

40 克酪蛋白溶解在大约 900 毫升水中, 再加 20 毫升 1 摩尔/升 NaOH, 连续振荡此悬浮液, 微热直至溶解, 最后用 1 摩尔/升 HCl 或 1 摩尔/升 NaOH 调到 pH8.5, 并用水稀释至 1 升。

2. 胰蛋白酶溶液 (40 克/升) 2000 毫升

可用由胰脏制备的粗胰蛋白酶制剂配制并放入冰箱内保存。

3. 甲醛溶液(400 克/升) 500 毫升

4. 酚酞(2.5 克/升乙醇) 200 毫升

5. 标准NaOH(约 0.1 摩尔/升)溶液 4,000 毫升

#### 五、操作:

分别向 6 个小锥形瓶中加入 5 毫升甲醛溶液和 1 滴酚酞并滴加 0.1 摩尔/升标准氢氧化钠溶液直至混合物呈微粉红色。所有锥形瓶中的颜色应当一致。

量取 100 毫升酪蛋白溶液, 加到一锥形瓶中, 在 37°C 水浴中保温 10 分钟。将胰蛋白酶液也在 37°C 水浴中保温 10 分钟。然后精确地量取 10 毫升酶液加到酪蛋白溶液中(同时记时!)。充分混合后, 随即取出 10 毫升反应混合物(作为零时的样品)吹至一含甲醛的锥形瓶中。向所取的反应混合物中加入酚酞(每毫升混合物加入 1 滴酚酞), 用 0.1 摩尔/升 NaOH 滴定直至呈微弱但持续的粉红色, 在接近到达终点之前, 再加入指示剂(每毫升氢氧化钠溶液加入 1 滴酚酞)。然后, 继续滴至终点, 记下所用 0.1 摩尔/升氢氧化钠溶液的毫升数。

在 2、4、6、8 和 10 分钟时, 分别取出 10 毫升消化样品, 准确

地照上法操作。在每个样品中滴定终点的颜色应当是一致的。用增加的滴定度对时间作图，测定初速度。

配制不同浓度的酪蛋白溶液(7.5、10、15、20、30 克/升)测定不同底物浓度时的活力。

用实验测得的结果，以  $\frac{1}{v}$  对  $\frac{1}{[S]}$  作图，求出  $V$  和  $K_m$  的数值。

## 实验十五 酶浓度对酶促反应速度的影响——用分光光度法测定碱性磷酸酶活性

### 一、目的：

1. 学习制作酶浓度与酶促反应速度关系曲线。
2. 学习用连续法测定碱性磷酸酶活力的原理和方法。

### 二、原理：

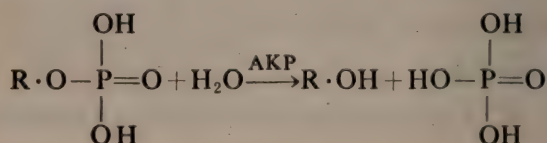
1. 酶促反应的反应速度与酶浓度成正比。根据米氏公式

$$v = \frac{V[S]}{K_m + [S]}, \text{ 当 } [S] \gg [E] \text{ 时, 则 } [E] = [ES], \text{ 最大反应速度 } V = k_2[E].$$

$$\therefore v = \frac{k_2[E][S]}{K_m + [S]} = \frac{k_2[S]}{K_m + [S]}[E]$$

当  $[S]$  保持不变时,  $V \propto [E]$ 。

2. 碱性磷酸酶(简写 AKP)主要存在于骨、肝、肾及肠中。它的最适 pH 在 9~10 之间，其数值随酶的来源、缓冲液种类、磷酸基团受体、同功酶组成、底物浓度等因素而有所不同。骨骼系统和肝胆患有疾病时，血清 AKP 增高。AKP 作用于磷酸酯，释放无机磷酸。



AKP 除以有机正磷酸酯为底物外,还可以焦磷酸酯, 偏磷酸酯为底物。常用产物无机磷酸或  $R \cdot OH$  的量来表示 AKP 的活性。在低温下 AKP 比较稳定。

本实验采用对硝基酚磷酸酯(简写 PNPP)为底物。在碱性条件下, PNPP 经 AKP 水解所产生的对硝基酚<sup>[注1]</sup>为黄色;在 420 毫微米处有光吸收峰,所以可用分光光度计直接跟踪对硝基酚,来了解酶促反应的进程。

### 三、器材:

1. 分析天平。
2. 布氏漏斗。
3. 抽滤瓶。
4. 玻璃水泵。
5. 分光光度计(每份备比色杯[光径 1cm]4~6 只)。
6. 秒表。
7. 加样器(可用代用器具)。
8. pH 计。
9. 烘箱。
10. 扁头玻棒(棒端弯成圆或扁钩)。
11. pH 试纸。

### 四、试剂和材料:

1. 0.1 摩尔/升 pH10.0 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液 1500 毫升
2. 50 微摩尔/升对硝基酚标准液 50 毫升

称取 69.5 毫克对硝基酚,溶于 100 毫升 0.1 摩尔/升, pH10.0 碳酸盐缓冲液中,再用缓冲液稀释 100 倍。

3. 对硝基酚磷酸钠(PNPP 钠盐)溶液 250 毫升

---

① 对硝基酚在酸性条件下无色,在碱性条件下为黄色。

### (1) 对硝基磷酸钡的制备:

称取 13.9 克对硝基酚, 溶于 50 毫升吡啶中。另取 9.7 毫升三氯化磷( $\text{POCl}_3$ , 亦称氧氯化磷或磷酰氯。它的吸湿性大, 应妥善保存, 不宜使用已吸潮的  $\text{POCl}_3$ 。)置 500 毫升烧杯中, 逐滴加入(速度不宜过慢)对硝基酚吡啶液。此反应有刺激性烟雾生成, 应在通风橱中操作。边加边用玻棒搅拌。抽滤去吡啶氯化物(白色固体或粘稠状物)后, 向反应液中逐滴加水直至无发热反应为止, 然后用蒸馏水稀释至 150 毫升, 加沸热氢氧化钡饱和液至反应为碱性(使酚酞变红)。此时已有沉淀析出。加等体积 99% 乙醇后, 置冰箱中。待沉淀完全后用布氏漏斗抽滤, 再以少量(以恰好复盖沉淀为度)50% 酒精洗沉淀一次。最后再以无水乙醇和乙醚各洗一次。所得淡黄色沉淀即 PNPP 钡盐 ( $\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_6\text{NPBa} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 分子量 = 390.4)。在  $50^\circ\text{C}$  干燥后, 放棕色瓶中保存。

### (2) 5 毫摩尔/升 PNPP 钠盐溶液制备:

称取 98 毫克 PNPP 钡盐, 溶于约 25 毫升蒸馏水中, (可加数滴 1 当量/升  $\text{HCl}$  助溶), 加入约 1.1 毫升 1 当量/升硫酸溶液以沉淀  $\text{Ba}^{2+}$ 。用 1 当量/升氢氧化钠溶液调 pH 至 3—3.5, 使  $\text{BaSO}_4$  沉淀完全。将沉淀液在冰箱静置片刻, 过滤以除去硫酸钡。向滤液中加一滴 1 当量/升硫酸溶液以检查  $\text{Ba}^{2+}$  是否沉淀完全, 然后用少量 1 当量/升氢氧化钠溶液调 pH 至 7, 用 0.1 摩尔/升 pH10.0 碳酸盐缓冲液定容到 100 毫升, 放棕色瓶中保存。

### 4. 3.3 单位/毫升碱性磷酸酶液

40 毫升

称取一定量碱性磷酸酶(1,100 单位/克), 用 0.1 摩尔/升 pH 10.0 碳酸盐缓冲液配成 3.3 单位/毫升。混匀, 溶解(勿猛烈振荡, 为什么?),  $4^\circ\text{C}$  保存可用一周。

## 五、操作方法:

1. 标准曲线的制作: 用 50 微摩尔/升对硝基酚标准液, 在



2.5—25 微摩尔/升范围内, 配制一系列不同浓度的标准液(不少于六个浓度)。测 420 毫微米处光吸收值。以光吸收值为纵坐标, 对硝基酚标准液浓度(微摩尔/升)为横坐标作图, 绘制对硝基酚标准曲线。

## 2. 测定不同酶浓度时的反应速度。

(1) 取比色杯(光径 1 厘米)4—5 只, 用铅笔在毛玻璃面标号。各加入 5 毫摩尔/升对硝基酚磷酸钠溶液 2 毫升。再依次向各杯中加入 0.1 摩尔/升 pH10.0 碳酸盐缓冲液 1.9、1.8、1.7、1.6、1.5 和 1.4 毫升, 并分别用扁头玻棒上下搅拌混匀(注意! 切忌用玻璃棒触及比色杯的透光面)。随后将各杯放置在分光光度计的比色杯架上, 在 420 毫微米波长下调定零点, (即加酶液前的底物空白), 用加样器(或代用器具)分别依次加入 0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5 毫升 3.3 单位/毫升的 AKP 液, 在加酶液的同时, 开动秒表计时, 并立即用扁头玻璃棒将杯中溶液混匀(这步操作越快越好, 每次的搅拌方式也应保持一致)。每隔 15 秒记录一次光吸收数值, 共记录三分钟(如仪器不稳、第一次读数可由半分钟开始)并记录室温。

(2) 以各杯所测得的光吸收值为纵坐标, 以时间为横坐标, 作图(是否都为通过原点的直线? 为什么?)。利用对硝基酚标准曲线求出每条直线段的斜率, 即在相同条件下不同酶浓度反应的初速度(以微摩尔/升/分表示)。

(3) 用不同酶浓度反应的初速度(用光吸收值/分表示)为纵坐标, 以酶浓度(用酶溶液的毫升数表示)为横坐标作图。将所绘制的曲线与前图比较。

## 实验十六 胰凝乳蛋白酶的制备 及活力测定

### 一、目的:

学习胰凝乳蛋白酶(又称胰糜蛋白酶)的制备和活力测定的原理及方法。

### 二、原理:

到目前为止,已知的酶都是蛋白质,因此一般提纯蛋白质的方法也适用于酶的提纯,所不同的是在提纯酶的过程中要不断地进行酶活力的检测。

比活力是指单位重量的蛋白质样品中所含酶活力的单位数。随着酶被逐步地纯化,其比活力也逐步地提高,因此,通常采用测定酶的比活力的方法来鉴定酶被逐步纯化的程度。

本实验从猪胰脏中提取、分离、纯化胰凝乳蛋白酶。采用酶活力单位数/毫克蛋白质样品表示酶的比活力。用福林(Folin)酚试剂法测定样品中的蛋白质含量。把在 pH7.4, 温度 25°C 时, 保温 10 分钟能使底物酪蛋白水解出  $10^{-4}$  毫克当量酪氨酸的胰凝乳蛋白酶规定为 1 个活力单位。酪氨酸与酚试剂作用产生蓝色, 其深浅与酪氨酸量成正比, 故用胰凝乳蛋白酶催化酪蛋白水解所得产物酪氨酸的多少来判定样品中胰凝乳蛋白酶的活力单位数。

### 三、器材:

1. 高速组织捣碎机。
2. 解剖刀、镊子、剪刀。
3. 烧杯(50 毫升和 100 毫升)。
4. 离心管、5 毫升刻度离心管。
5. 漏斗。

6. 纱布、棉线。
7. 吸管(10、5、2、1、0.5 毫升)。
8. 玻棒及滴管。
9. 透析袋。
10. 黑瓷板。
11. 台秤、分析天平。
12. 离心机。
13. 恒温水浴。
14. 显微镜载玻片、盖玻片。
15. 分光光度计。

#### 四、试剂和材料:

1. 新鲜猪胰脏 1-2 个
2. 0.25 当量/升  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液 1,000 毫升  
取蒸馏水 200 毫升, 缓缓滴加浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$  7.0 毫升, 然后加蒸馏水至 1,000 毫升。
3. 固体  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  40 克
4. 1%  $\text{BaCl}_2$  溶液 25 毫升
5. 1% 酪蛋白溶液 100 毫升

称酪蛋白 1.0 克、加 pH8.0, 0.1 摩尔/升磷酸盐缓冲液 100 毫升, 在沸水中煮 5 分钟使之溶解, 冰箱中保存。

6. 磷酸盐缓冲液 (0.1 摩尔/升, pH7.4) 1,500 毫升
7. 10% 三氯乙酸溶液。 300 毫升
8. 0.1 当量/升  $\text{NaOH}$  溶液 2,500 毫升
9. 碱性铜溶液 1,500 毫升

甲液: 20 克碳酸钠、4 克氢氧化钠和 0.1 克酒石酸钾共溶于 1,000 毫升水中。

乙液: 0.5 克  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  溶于 100 毫升水中。

临用前按甲液 50 毫升和乙液 1 毫升比例混合。此溶液可用一日。

10. 酚试剂 1,500 毫升

见本书第十一章实验十三枯草杆菌蛋白酶活力的测定。

11. 标准母液：称干燥酪氨酸 115.9 毫克溶于 0.2 当量/升 HCl 1,000 毫升中，此溶液相当于 40 单位/毫升的胰凝乳蛋白酶溶液。

将标准母液做如下稀释①：

稀释液 编号	相当胰凝乳蛋白酶的 活力数 (活力单位/2毫升)	配 制 方 法
①	8	标准母液 10 毫升 + (0.2 当量/升) HCl 90 毫升
②	6	①号稀释液 20 毫升 + ③号稀释液 20 毫升
③	4	①号稀释液 20 毫升 + (0.2 当量/升) HCl 20 毫升
④	2	③号稀释液 20 毫升 + (0.2 当量/升) HCl 20 毫升
⑤	1	④号稀释液 20 毫升 + (0.2 当量/升) HCl 20 毫升

## 五、操作方法②：

1. 胰凝乳蛋白酶的提纯：整个操作过程在  $0^{\circ}$ — $5^{\circ}\text{C}$  条件下进行。

① 提取：取新鲜猪胰脏，放在盛有冰冷 0.25 当量/升  $\text{H}_2\text{SO}_4$  的容器中，保存在冰箱中待用。去除胰脏表面的脂肪和结缔组织后，称重。用组织捣碎机绞碎③。然后混悬于两倍体积的冰冷 0.25 当量/升  $\text{H}_2\text{SO}_4$  中，放冰箱内过夜。将上述混悬液离心 10 分钟，上层液经两层纱布过滤至烧杯中；将沉淀再混悬于等体积的冰冷

① 标准母液由准备室配制，母液稀释由学生自己操作。

② 本实验共分两次做。第一次做胰凝乳蛋白酶提纯，第二次做胰凝乳蛋白酶比活力的测定。

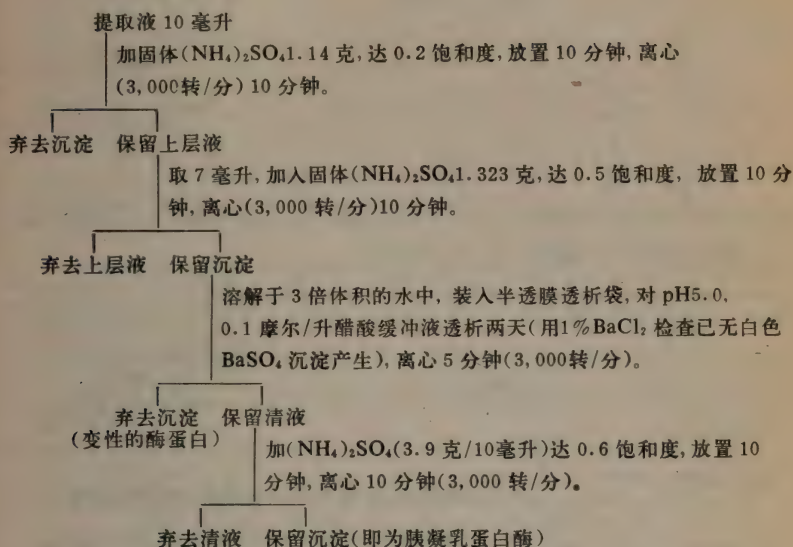
③ 此步骤可根据具体情况由准备室做或由学生分组做。



0.25 当量/升  $\text{H}_2\text{SO}_4$  中,再离心,将两次上层液合并,即为提取液。

留样测蛋白质和酶活力。

## ② 分离:



③ 结晶:取分离所得的胰凝乳蛋白酶溶于 3 倍体积的水中,取 0.5 毫升留样测蛋白质和酶活力。然后加  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1.44 克/10 毫升) 至胰凝乳蛋白酶溶液达 0.25 饱和度,用 0.1 当量/升  $\text{NaOH}$  调节 pH 至 6.0,在室温 (25—30°C) 放置 12 小时即可出现结晶。在显微镜下观察结晶形状。

## 2. 胰凝乳蛋白酶比活力的测定。

### ① 样品蛋白质含量的测定。

#### (1) 蛋白质标准曲线的制备①

准确量取一定量的人血清或牛血清清蛋白用凯氏定氮法测定其蛋白质实际含量。

① 蛋白质标准曲线可由准备室提供。

另准确取 10 毫克的人血清或牛血清清蛋白，用蒸馏水溶解，定容到 10 毫升。再继续按下法配制蛋白质稀释液。

	蛋白质原液(毫升)	蒸馏水(毫升)
(1) 液	0.4	9.6
(2) 液	0.5	9.5
(3) 液	0.6	9.4
(4) 液	0.8	9.2
(5) 液	1.0	9.0

取试管 6 支, 编号, 按下表操作:

编 号	1	2	3	4	5	6
标准样品(毫升)	(1)液2.0	(2)液2.0	(3)液2.0	(4)液2.0	(5)液2.0	—
蒸馏水(毫升)	—	—	—	—	—	2.0
碱性铜溶液(毫升)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
混 匀 后 于 室 温 中 放 置 20 分 钟						
酚试剂(毫升)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

混匀各管, 30 分钟后, 以第六管为空白管(光径为 0.5 厘米), 在波长 680nm 处读取光吸收值。

按凯氏定氮法测得的蛋白质含量, 算出各管的蛋白质浓度, 以此为横坐标, 各管的光吸收值为纵坐标作图, 得标准曲线。

## (2) 测定样品蛋白质含量

将胰凝乳蛋白酶提取液 A、0.6 饱和度  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  制得的胰凝乳蛋白酶 B、胰蛋白酶结晶溶液 C、分别用 pH7.4 0.1 摩尔/升磷酸盐缓冲液稀释适当倍数<sup>①</sup>

① 根据经验提供以下稀释倍数仅供参考

A、B、C 分别稀释 200 倍。

取 4 支试管, 编号, 按下表操作:

管 号	A	B	C	对照
样品(毫升)	2.0	2.0	2.0	—
蒸馏水(毫升)	—	—	—	2.0
碱性铜溶液(毫升)	2.0	2.0	2.0	2.0
混 匀 后 于 室 温 中 放 置 20 分 钟				
酚试剂(毫升)	0.2	0.2	0.2	0.2

立即混匀, 放置 30 分钟, 测定 680nm 波长的光吸收值 (以蒸馏水调零点, 光径为 0.5 厘米)。用 A、B、C 各管的光吸收值、分别减去对照的光吸收值, 然后查蛋白质标准曲线, 得出每毫升稀释样品的蛋白质含量, 再计算出 A、B、C 三种制剂每毫升中蛋白质的含量。

## ② 样品中胰凝乳蛋白酶活力的测定;

### (1) 制备标准曲线①按下表加液。

管 号	①	②	③	④	⑤	对照
酪氨酸标准液(见试剂11) (毫升)	(1)液2.0	(2)液2.0	(3)液2.0	(4)液2.0	(5)液2.0	(水)2.0
0.1 当量/升NaOH(毫升)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
碱性铜溶液(毫升)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
酚试剂(毫升)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

混匀, 放置 30 分钟, 测 680nm 光吸收值。以光吸收值为纵坐标, 酶活性单位为横坐标, 绘制标准曲线。

### (2) 样品中胰凝乳蛋白酶活力测定:

① 可由准备室提供。

将上述三种制剂(A、B、C)分别用 pH7.4, 0.1 摩尔/升磷酸盐缓冲液稀释适当倍数<sup>①</sup>。

取试管四支, 编号, 按下表操作:

管 号	A	B	C	对照
1% 酪蛋白液(毫升)	1.0	1.0	1.0	—
pH7.4, 0.1 摩尔/升磷酸盐缓冲液(毫升)	1.0	1.0	1.0	2.0
摇匀, 放入 25°C 水浴中 10 分钟				
样品(毫升)	1.0	1.0	1.0	1.0
摇匀, 继续保温 10 分钟				
10% 三氯醋酸(毫升)	2.0	2.0	2.0	2.0

放置 10 分钟后过滤。

取试管 4 支, 编号, 按下表操作:

管 号	A	B	C	对照
滤液(毫升)	2.0	2.0	2.0	2.0
0.1 当量/升 NaOH 溶液(毫升)	2.0	2.0	2.0	2.0
碱性铜溶液(毫升)	2.0	2.0	2.0	2.0
酚试剂(毫升)	0.2	0.2	0.2	0.2

混匀, 放置 30 分钟后分别测定 680nm 波长的光吸收值(以蒸馏水调零点)。将各管的光吸收值分别减去对照管的光吸收值, 然后查标准曲线, 算出每毫升胰凝乳蛋白酶稀释液的活力单位数。

#### ④ 计算:

比活力 = 胰凝乳蛋白酶活力单位数 / 蛋白质毫克数

<sup>①</sup> 根据经验提供以下稀释倍数, 仅供参考。A 稀释 400 倍。B 稀释 800 倍。C 稀释 2,000 倍。以上稀释倍数可根据实验具体情况确定。临测定前再稀释。





### 三、器材:

1. 试管及试管架。
2. 吸管(5、2、1、0.5 毫升)。
3. 滴管。
4. 玻璃棒。
5. 恒温水浴。
6. 沸水浴。
7. 小台秤。
8. 剪刀及镊子。
9. 漏斗。
10. 冰浴。
11. 表面皿。
12. 橡皮塞。
13. 滤纸。
14. 量筒(10毫升)

### 四、试剂和材料

1. 大白鼠
2. 0.5% 糖原溶液(或 0.5% 淀粉溶液) 80 毫升
3. 液体石蜡 100 毫升
4. 15% 偏磷酸溶液 80 毫升
5. 氢氧化钙(粉末) 20 克
6. 浓硫酸 100 毫升
7. 饱和硫酸铜溶液 50 毫升。硫酸铜溶解度为 20.7 克(20°C)
8. 1/15 摩尔/升磷酸缓冲液 200 毫升

(1) 1/15 摩尔/升磷酸二氢钾溶液: 称量 9.078 克  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶于蒸馏水中, 于 1000 毫升容量瓶中稀释到刻度。

(2) 1/15 摩尔/升磷酸氢二钠溶液: 称量 11.876 克

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (或 23.894 克  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 溶于蒸馏水中, 于 1000 毫升容量瓶中定容到刻度。

1/15 摩尔/升磷酸缓冲液(pH7.4): 将上述(1)液与(2)液按 1:4 的体积比混合, 即成为 pH7.4 的缓冲液。

9. 1.5% 对羟基联苯试剂 20 毫升: 称取对羟基联苯 1.5 克, 溶于 100 毫升 0.5% 氢氧化钠溶液中, 配成 1.5% 的溶液。若对羟基联苯颜色较深, 应用丙酮或无水乙醇重结晶。此试剂放置时间长久后, 会出现针状结晶, 应摇匀后使用。

## 五、操作方法:

### 1. 肌肉糜的制备:

鼠被处死后, 放血。立即割取死鼠背部和腿部的肌肉。在低温条件下用剪刀把肌肉剪碎制成肌肉糜, 低温保存备用(应在临用前制备)。

### 2. 肌肉糜的糖酵解

(1) 取 4 支试管, 编号。各加入 3 毫升 pH7.4 的磷酸缓冲液和 1 毫升 0.5% 糖原溶液(或 0.5% 淀粉溶液)。1 和 2 号管为试验管, 3 和 4 号管为对照管。向对照管内加入 15% 偏磷酸溶液 2 毫升, 以沉淀蛋白质和终止酶的反应。然后在每支试管中加入新鲜肌肉糜 0.5 克, 用玻璃棒将肌肉碎块打散, 搅匀, 再分别加入一薄层液体石蜡(约 1 毫升/管)以隔绝空气。将 4 支试管同时放入 37°C 恒温水浴中保温。

(2) 1—1.5 小时后取出试管, 立即向试管内加入 15% 偏磷酸溶液 2 毫升并混匀。将各试管内容物分别过滤, 弃去沉淀。量取每个样品的滤液 4 毫升, 分别加入已编号的试管中, 然后向每管内加入饱和硫酸铜溶液 1 毫升, 混匀, 再加入 0.4 克氢氧化钙粉末, 塞上橡皮塞后用力振荡。因皮肤上有乳酸勿与手指接触。放置 30 分钟, 并不时振荡, 使糖沉淀完全。将每个样品分别过滤, 弃去沉淀。

### 3. 乳酸的测定:

取 4 支洁净、干燥的试管,编号。各加入浓硫酸 1.5 毫升和 2—4 滴对羟基联苯试剂,混匀后放入冰浴中冷却。将每个样品的滤液 0.25 毫升逐滴加入到已冷却的上述硫酸与对羟基联苯混合液中,随加随摇动冰浴中的试管,注意冷却。

将各试管混合均匀,放入沸腾的水浴锅中待显色后即取出,比较和记录各管溶液的颜色深浅,并加以解释。

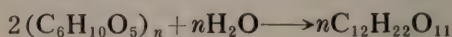
## 实验十八 小麦萌发前后淀粉酶活力的比较

### 一、目的:

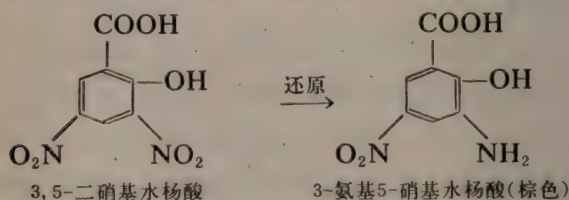
1. 学习分光光度计的原理和使用方法。
2. 学习测定淀粉酶活力的方法。
3. 了解小麦萌发前后淀粉酶活力的变化。

### 二、原理:

种子中贮藏的碳水化合物主要以淀粉的形式存在。淀粉酶能使淀粉分解为麦芽糖。



麦芽糖有还原性,能使 3,5-二硝基水杨酸还原成棕色的 3-氨基 5-硝基水杨酸。后者可用分光光度计法测定。



休眠种子的淀粉酶活力很弱,种子吸胀萌动后,酶活力逐渐增强,并随着发芽天数的增长而增加。



本实验观察小麦种子萌发前后淀粉酶活力的变化。

### 三、器材:

1. 25 毫升刻度试管。
2. 吸管。
3. 乳钵。
4. 离心管。
5. 分光光度计。
6. 离心机。
7. 恒温水浴。

### 四、试剂:

1. 0.1% 标准麦芽糖溶液 20 毫升: 精确称量 100 毫克麦芽糖, 用少量水溶解后, 移入 100 毫升容量瓶中, 加蒸馏水至刻度。
2. pH6.9, 0.02 摩尔/升磷酸缓冲液 100 毫升:  
0.2 摩尔/升磷酸二氢钾 67.5 毫升与 0.2 摩尔/升磷酸氢二钾 82.5 毫升混合, 稀释 10 倍。
3. 1% 淀粉溶液 100 毫升: 1 克可溶性淀粉溶于 100 毫升 0.02 摩尔/升磷酸缓冲液中, 其中含有 0.0067 摩尔/升氯化钠。
4. 1% 3, 5-二硝基水杨酸试剂 200 毫升: 1 克 3, 5-二硝基水杨酸溶于 20 毫升 2 当量/升的氢氧化钠溶液和 50 毫升水中; 再加入 30 克酒石酸钾钠, 定容至 100 毫升。若溶液混浊, 可过滤。
5. 1% 氯化钠溶液 300 毫升      6. 海砂 5 克

### 五、操作步骤:

#### 1. 种子发芽:

小麦种子浸泡 2.5 小时后, 放入 25°C 恒温箱内或在室温下发芽<sup>①</sup>。

---

① 小麦萌发所需要的时间与品种有关, 若难以萌发, 可适当延长浸泡时间和发芽时间。

## 2. 酶液提取:

取发芽第三天或第四天的幼苗 15 株, 放入乳钵内, 加海砂 200 毫克, 加 1% 氯化钠溶液 10 毫升, 用力磨碎。在室温下放置 20 分钟, 搅拌几次。然后将提取液离心 (1,500 转/分) 6—7 分钟。将上清液倒入量筒, 测定酶提取液的总体积。进行酶活力测定时, 将酶提取液稀释 10 倍。

取干燥种子或浸泡 2.5 小时后的种子 15 粒作为对照 (提取步骤同上)。

## 3. 酶活力测定:

(1) 取 25 毫升刻度试管 4 支。编号。按下表要求加入各试剂 (各试剂须在 25°C 预热 10 分钟)。

试管 标号 试剂	1	2	3	4
	干燥种子(或浸泡 2.5 小时后)的酶提取液	发芽三天或四天幼苗的酶提取液	标准管	空白管
酶液(毫升)	0.5	0.5	—	—
标准麦芽糖溶液(毫升)	—	—	0.5	—
1% 淀粉溶液(毫升)	1	1	1	1
水(毫升)	—	—	—	0.5

将各管混匀, 放在 25°C 水浴中, 保温 3 分钟后, 立即向各管中加入 10% 3,5-二硝基水杨酸溶液 2 毫升。

(2) 取出各试管, 放入沸水浴中加热 5 分钟。冷至室温, 加水稀释至 25 毫升。将各管充分混匀。

试 管 号	1. 干燥种子的酶提取液	2. 发芽三、四天幼苗的酶提取液	3. 标准	4. 空白
500nm 光吸收值				

(3) 用空白管作对照；在 500 毫微米处<sup>①</sup>测定各管的光吸收值，将读数填入上表。

#### 4. 计算

根据溶液的浓度与光吸收值成正比的关系，即： $\frac{A_{\text{标准}}}{A_{\text{未知}}} = \frac{C_{\text{标准}}}{C_{\text{未知}}}$ ：

$$\text{则 } C(\text{酶液管浓度}) = \frac{A_{\text{酶}} \times C_{\text{标准}}}{A_{\text{标准}}}。$$

式中  $C$  代表浓度； $A$  为光吸收值。

本实验规定：25°C 时 3 分钟内水解淀粉释放 1 毫克麦芽糖所需的酶量为 1 个酶活力单位。则 15 株种子或 15 株幼苗的总活力单位 =  $C_{\text{酶}} \times n_{\text{酶}} \times V_{\text{酶}}$

$C_{\text{酶}}$  = 酶液的浓度

$n_{\text{酶}}$  = 酶液稀释倍数

$V_{\text{酶}}$  = 提取酶液的总体积。

### 实验十九 血糖的定量测定 Hagedorn-Jensen 二氏定糖法

#### 一、目的：

学习用 Hagedorn-Jensen 二氏微量滴定法测定血糖含量。

#### 二、原理：

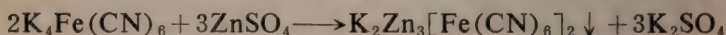
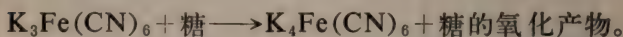
动物血液中的糖主要是葡萄糖，其含量较恒定。健康家兔的血糖水平为 80—120 毫克%。用硫酸锌和氢氧化钠除去被检血中的蛋白质制成无蛋白血滤液。当将血滤液与标准铁氰化钾溶液共热时，一部分铁氰化钾还原成亚铁氰化钾，并与锌离子生成不溶性化合物。

向混合液中加入碘化物后，用硫代硫酸钠溶液滴定所释放的碘。即可知剩余的铁氰化钾量。血糖越多，剩余的铁氰化钾越少，所

<sup>①</sup> 如用光电比色计，使用绿色滤光板。

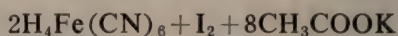
消耗的硫代硫酸钠也越少。硫代硫酸钠溶液用量与血糖浓度的关系可以由经验确定下来的数字表查出。此过程可用反应式表示如下:

1. 还原反应:



由于产生不溶性化合物, 糖的还原反应进行得比较完全。

2. 用碘量法测定剩余的标准  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  溶液:



三、器材:

1. 微量滴定管。
2. 0.1 毫升微量吸血管。
3. 沸水浴。
4. 50×90 毫米大试管。

四、试剂与材料:

- |                        |        |
|------------------------|--------|
| 1. 0.45% 硫酸锌溶液(新鲜配制)   | 250 毫升 |
| 2. 0.1摩尔/升氢氧化钠溶液(新鲜配制) | 50 毫升  |
| 3. 0.005 当量/升铁氰化钾碱性溶液  | 100 毫升 |

用分析天平称化学纯铁氰化钾 165 克、溶解后加入预先准备好的煅制无水碳酸钠 10.6 克, 定容到 1 升。将溶液放在棕色瓶内, 于阴暗处保存。

- |            |        |
|------------|--------|
| 4. 氯-锌-碘溶液 | 200 毫升 |
|------------|--------|

取硫酸锌 50 克及纯氯化钠 250 克, 定容到 1 升, 作为母液。临用前根据所需用的试剂量加入碘化钾, 使它在混合液中的浓度为 25 克/升。



5. 标准 0.005 当量/升硫代硫酸钠溶液 360 毫升

临用时由标准 0.1 当量/升硫代硫酸钠溶液稀释。

6. 3% 醋酸溶液(不应含铁) 100 毫升

7. 1% 可溶性淀粉溶液 20 毫升

1 克可溶性淀粉溶于 10 毫升沸水中, 然后加入到 90 毫升饱和氯化钠溶液中。此溶液可作为大多数碘量法滴定的指示剂, 可长期保存。

8. 兔。

### 五、操作方法:

1. 取二个试管, 各加入 0.45% 硫酸锌 5 毫升及 0.1 摩尔/升氢氧化钠溶液 1 毫升, 此时产生氢氧化锌胶状沉淀。

2. 将兔耳去毛后, 用二甲苯擦拭使之充血。用棉球擦干, 用针头刺破耳静脉并迅速用微量吸管精确地吸取血液 0.1 毫升。擦去吸管尖端周围的血。将血吸入一个装有氢氧化锌的试管中, 并仔细地用吸入和放出溶液的方法洗微量吸管三次。另一试管中加入 0.1 毫升蒸馏水为对照管。

3. 将两个试管同时放入沸水浴中。准确煮沸四分钟后将二试管的内容物用滤纸分别过滤到两个大试管内, 用蒸馏水冲洗沉淀和原来的试管两次, 每次都用水 3 毫升。将溶液并在一起。

4. 向每个试管内用吸管精确地加入标准铁氰化钾碱性溶液 2 毫升, 一同放入沸水浴中煮沸 15 分钟<sup>①</sup>。

5. 冷却后分别加入氯-锌-碘溶液 3 毫升及 3% 醋酸 2 毫升, 混匀。各加淀粉液两滴。用标准硫代硫酸钠溶液滴定至蓝色消失为止。

### 六、血糖含量的计算:

---

① 如无大试管, 在此步骤中可将溶液定量转移至 50 毫升锥形瓶中再滴定。

根据血糖换算表将样品滴定值和对照滴定值折合成糖值。将此两糖值的差乘以 1000, 即为 100 毫升血液中含葡萄糖毫克数。

下表列出 0.005 当量/升硫代硫酸钠溶液的用量(毫升)和血糖含量(毫克/毫升)的换算关系。

表中最左边纵行中的数字是滴定时消耗 0.005 当量/升硫代硫酸钠溶液的毫升数的整数及小数后第一位。表中最上的横行代表其小数后第二位数字, 表中交叉点的数字为 0.1 毫升血液中所含葡萄糖的毫克数。

硫代硫酸钠的 毫升数	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09
0.0	0.385	0.382	0.379	0.376	0.373	0.370	0.367	0.364	0.361	0.358
0.1	0.355	0.352	0.350	0.348	0.345	0.343	0.341	0.338	0.336	0.333
0.2	0.331	0.329	0.327	0.325	0.323	0.321	0.318	0.316	0.314	0.312
0.3	0.310	0.308	0.306	0.304	0.302	0.300	0.298	0.296	0.294	0.292
0.4	0.290	0.288	0.286	0.284	0.282	0.280	0.278	0.276	0.274	0.272
0.5	0.270	0.268	0.266	0.264	0.262	0.260	0.259	0.257	0.255	0.253
0.6	0.251	0.249	0.247	0.245	0.243	0.241	0.240	0.238	0.236	0.234
0.7	0.232	0.230	0.228	0.226	0.224	0.222	0.221	0.219	0.217	0.215
0.8	0.213	0.211	0.209	0.208	0.206	0.204	0.202	0.200	0.199	0.197
0.9	0.195	0.193	0.191	0.190	0.188	0.186	0.184	0.182	0.181	0.179
1.0	0.177	0.175	0.173	0.172	0.170	0.168	0.166	0.164	0.163	0.161
1.1	0.159	0.157	0.155	0.154	0.152	0.150	0.148	0.146	0.145	0.143
1.2	0.141	0.139	0.138	0.136	0.134	0.132	0.131	0.129	0.127	0.125
1.3	0.124	0.122	0.120	0.119	0.117	0.115	0.113	0.111	0.110	0.108
1.4	0.106	0.104	0.102	0.101	0.099	0.097	0.095	0.093	0.092	0.090
1.5	0.088	0.086	0.084	0.083	0.081	0.079	0.077	0.075	0.074	0.072
1.6	0.070	0.068	0.066	0.065	0.063	0.061	0.059	0.057	0.056	0.054
1.7	0.052	0.050	0.048	0.047	0.045	0.043	0.041	0.039	0.038	0.036
1.8	0.034	0.032	0.031	0.029	0.027	0.025	0.024	0.022	0.020	0.019
1.9	0.017	0.015	0.014	0.012	0.010	0.008	0.007	0.005	0.003	0.002

## 实验二十 胰岛素对血糖浓度的影响

### 一、目的:

通过观察家兔注射胰岛素前后的血糖浓度变化, 了解胰岛素对动物血糖含量的调节作用。

### 二、原理:

人和动物的血糖浓度受各种激素的调节。胰岛素能加速血糖的氧化和促进糖原的合成。皮下或静脉注射胰岛素可引起血糖降低。

### 三、器材:

1. 刀片。
2. 吸管。
3. 试管和试管架。
4. 0.1 毫升吸血管。

### 四、试剂和材料:

1. 家兔。
2. 市售胰岛素制剂(每毫升含 20 或 40 单位)。
3. 1 单位/毫升胰岛素溶液 12 毫升  
(用胰岛素制剂稀释而成)。
4. 二甲苯溶液 20 毫升
5. 0.45% 硫酸锌溶液(新鲜配制) 500 毫升
6. 0.1 摩尔/升氢氧化钠溶液(新鲜配制) 100 毫升
7. 40% 葡萄糖溶液 50 毫升
8. Hagedorn-Jensen 二氏定糖法全部试剂(其量为实验十九试剂用量的 2 倍)。

### 五、操作方法:

1. 准备已饥饿 16—24 小时的家兔一只, 体重为 2—3 公斤。
  2. 取 3 支试管, 各加入 0.45% 硫酸锌溶液 5 毫升和 0.1 摩尔/升氢氧化钠溶液 1 毫升, 混匀备用。
  3. 向第 1 支试管中精确加入兔血 0.1 毫升。
- 第 2 支试管为对照管, 其中不加血液, 而加 0.1 毫升水。按 Hagedorn-Jensen 二氏定糖法(见实验十九)测定血糖。
4. 按每公斤体重 1 单位胰岛素剂量给家兔皮下注射胰岛素。1 小时后, 再由耳静脉取血。向第 3 支试管中加入 0.1 毫升兔血, 用同法测定血糖, 不用再做对照。取血后, 立即向腹腔或皮下注射 25% 葡萄糖液 10 毫升, 以免家兔发生胰岛素性休克而死亡。
  5. 比较两次测定的数据, 计算注射胰岛素后血糖降低的百分率。

## 实验二十一 发酵过程中无机磷的利用

### 一、目的:

1. 掌握定磷法的原理和操作技术。
2. 了解发酵过程中无机磷的作用。

### 二、原理:

酵母能使蔗糖和葡萄糖发酵产生乙醇和二氧化碳。此发酵作用和酵解作用的中间步骤基本相同。在酵母体内蔗糖先经蔗糖酶水解为葡萄糖和果糖, 葡萄糖和果糖在发酵过程中再经磷酸化作用和其他反应生成各种磷酸酯。

本实验利用无机磷与钼酸形成的磷钼酸络合物能被还原剂  $\alpha$ -1, 2, 4-氨基萘酚磺酸钠还原成钼蓝的原理来测定发酵前后反应混合物中无机磷的含量, 用以观察发酵过程中无机磷的消耗。

### 三、器材:



1. 试管及试管架。

2. 乳钵。

3. 吸管。

4. 小漏斗。

5. 滤纸。

6. 恒温水浴。

7. 分光光度计。

8. 锥形瓶。

#### 四、试剂与材料:

1. 新鲜啤酒酵母 500 克

2. 蔗糖 50 克

3. 磷酸盐溶液 200 毫升

称取  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  120.7 克 (或  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  60 克) 和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20 克溶解于蒸馏水中, 定容至 1000 毫升, 在冰箱中贮存备用。临用时稀释 1—5 倍。

4. 标准磷酸盐溶液 500 毫升

将磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 在  $110^\circ\text{C}$  烘 2 小时, 在干燥器中冷却后, 准确称取 0.1098 克, 用蒸馏水溶解, 定容到 1000 毫升, 成为每毫升溶液含 25 微克无机磷的标准磷酸盐溶液。

5. 5% 三氯乙酸溶液 500 毫升

6. 6 当量/升硫酸和 2.5% 钼酸铵等体积混合液 1000 毫升

7.  $\alpha$ -1, 2, 4-氨基萘酚磺酸溶液 100 毫升

将 0.25 克  $\alpha$ -1, 2, 4-氨基萘酚磺酸, 15 克亚硫酸氢钠及 0.5 克亚硫酸钠溶于 100 毫升蒸馏水中。使用前, 加水 3 份混合均匀。

#### 五、操作方法:

1. 标准曲线的制定:

按下表次序在各管内加入不同量的标准磷酸盐溶液和试剂,

充分摇匀后于 37°C 水浴中保温 10 分钟。冷后，在 660 毫微米波长下测定光吸收值，以含磷总量为横坐标，光吸收值为纵坐标，绘制标准曲线。应注意，不可待各管都加完  $\alpha$ -1, 2, 4-氨基萘酚磺酸钠溶液以后再同时混匀。应加一管，混匀一管，保温一管，力求各管的无机磷与还原剂反应的时间严格一致。

管号	标准磷酸盐溶液 (毫升)	含磷量 (微克)	蒸馏水 (毫升)	钼酸铵-硫酸 混合液 (毫升)	$\alpha$ -1, 2, 4-氨基 萘酚磺酸钠溶液 (毫升)	37°C 水浴保温十分 分钟后冷却至 室温	660nm 光吸收值
1	0	0	3.0	2.5	0.5		
2	0.2	5	2.8	2.5	0.5		
3	0.4	10	2.6	2.5	0.5		
4	0.6	15	2.4	2.5	0.5		
5	0.8	20	2.2	2.5	0.5		
6	1.0	25	2.0	2.5	0.5		

## 2. 酵母发酵:

称取 2—4 克新鲜啤酒酵母<sup>①</sup>和 1 克蔗糖，放入研钵内仔细研碎。加入 5 毫升蒸馏水和 5 毫升磷酸盐溶液研磨均匀。将匀浆转移至 50 毫升锥形瓶中并立即取出 0.5 毫升均匀的悬浮液，加入到已盛有 3.5 毫升三氯乙酸溶液的试管中，摇匀，作为试样 1。将锥形瓶放入 37°C 恒温水浴中，每隔 30 分钟取出 0.5 毫升悬浮液，立即加入到已盛有 3.5 毫升三氯乙酸溶液的试管中，摇匀。共取三次作为试样 2, 3, 4。将每个试样静置 10 分钟后用干滤纸过滤以分别取得各试样的无蛋白滤液。注意在每次吸取悬浮液前，将锥形

<sup>①</sup> 在本实验的预备试验中，应首先摸索酵母的用量及磷酸盐的稀释倍数。这取决于酵母的新鲜程度及原发酵液中无机磷的基础含磷量。可先依上述操作做一试样 1，测其光吸收值，变更酵母用量和磷酸盐的稀释倍数使试样 1 的光吸收值在 0.5 左右，如此测定效果明显，目测也可分辨各试样的颜色梯度。

瓶中的混合物充分摇匀。

### 3. 无机磷的测定:

取 5 支洁净干燥的试管。编号后按下表加入各种溶液并按标准曲线制定的同样方法操作, 分别测定各管 660nm 的光吸收值, 各管均应作一平行管, 取其光吸收的平均值, 从标准曲线上查出各试样的无机磷含量, 以试样 1 的无机磷含量为 100%, 计算酵母发酵 30、60 和 90 分钟后消耗无机磷的相对百分数。

管号	发酵时间 (分)	无蛋白滤液 (毫升)	蒸馏水 (毫升)	钼酸铵-硫酸 溶液 (毫升)	$\alpha$ -1, 2, 4-氨基 萘酚磺酸 钠溶液 (毫升)	37°C 保温 十分 钟后 冷却 至室 温	660nm 光吸收值
1	0	0.1(试样1)	2.9	2.5	0.5		
2	30	0.1(试样2)	2.9	2.5	0.5		
3	60	0.1(试样3)	2.9	2.5	0.5		
4	90	0.1(试样4)	2.9	2.5	0.5		
5	—	—	3.0	2.5	0.5		

## 实验二十二 脂肪酸的 $\beta$ -氧化

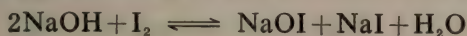
### 一 目的:

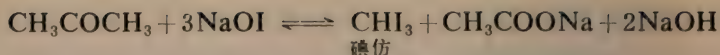
了解脂肪酸的  $\beta$ -氧化作用。

### 二、原理:

在肝脏中, 脂肪酸经  $\beta$ -氧化作用生成乙酰辅酶 A。两分子乙酰辅酶 A 可缩合生成乙酰乙酸。乙酰乙酸可脱羧生成丙酮, 也可还原生成  $\beta$ -羟丁酸。乙酰乙酸、 $\beta$ -羟丁酸和丙酮总称为酮体。

本实验用新鲜肝糜与丁酸保温, 生成的丙酮在碱性条件下, 与碘生成碘仿。反应式如下:





剩余的碘, 可用标准硫代硫酸钠溶液滴定。



根据滴定样品与滴定对照所消耗的硫代硫酸钠溶液体积之差, 可以计算由丁酸氧化生成丙酮的量。

### 三、器材:

1. 5 毫升微量滴定管。
2. 恒温水浴。
3. 吸管。
4. 剪刀及镊子。
5. 50 毫升锥形瓶。
6. 漏斗。
7. 试管及试管架。

### 四、试剂和材料:

1. 大白鼠
  2. 0.1% 淀粉溶液 20 毫升
  3. 0.9% 氯化钠溶液 200 毫升
  4. 0.5 当量/升丁酸溶液 150 毫升
- 取 5 毫升丁酸溶于 100 毫升 0.5 当量/升氢氧化钠溶液中。
5. 15% 三氯乙酸溶液 200 毫升
  6. 10% 氢氧化钠溶液 150 毫升
  7. 10% 盐酸溶液 150 毫升
  8. 0.1 当量/升碘溶液 200 毫升

称取 12.7 克碘和约 25 克碘化钾溶于水中, 稀释到 1000 毫升, 混匀, 用标准 0.1 当量/升硫代硫酸钠溶液标定。



9. 标准 0.02 当量/升硫代硫酸钠溶液 500 毫升  
临用时将已标定的 1 当量/升硫代硫酸钠溶液稀释成 0.02 当量/升。

10. 1/15 摩尔/升 pH7.6 磷酸盐缓冲液 200 毫升  
 $\frac{1}{15}$  摩尔/升磷酸氢钠 86.8 毫升与  $\frac{1}{15}$  摩尔/升磷酸二氢钠 13.2 毫升混合。

### 五、操作方法:

1. 肝糜制备: 将大鼠颈部放血处死, 取出肝脏。用 0.9% 氯化钠溶液洗去污血。用滤纸吸去表面的水分。称取肝组织 5 克置研钵中。加少量 0.9% 氯化钠溶液, 研磨成细浆。再加 0.9% 氯化钠溶液至总体积为 10 毫升。

2. 取 2 个 50 毫升锥形瓶, 各加入 3 毫升 1/15 摩尔/升 pH7.6 的磷酸盐缓冲液。向一个锥形瓶中加入 2 毫升正丁酸; 另一个锥形瓶作为对照, 不加正丁醇。然后各加入 2 毫升肝组织糜。混匀, 置于 43°C 恒温水浴内保温。

3. 沉淀蛋白质: 保温 1.5 小时后, 取出锥形瓶, 各加入 3 毫升 15% 三氯乙酸溶液, 在对照瓶内追加 2 毫升正丁酸, 混匀, 静置 15 分钟后过滤。将滤液分别收集在 2 支试管中。

4. 酮体的测定: 吸取两种滤液各 5 毫升分别放入另外两个锥形瓶中, 再各加 3 毫升 0.1 当量/升碘溶液和 3 毫升 10% 氢氧化钠溶液。摇匀后, 静置 10 分钟。加入 3 毫升 10% 盐酸溶液中和。然后用 0.02 当量/升标准硫代硫酸钠溶液滴定剩余的碘。滴至浅黄色时, 加入 3 滴淀粉溶液作指示剂。摇匀, 并继续滴到蓝色消失。记录滴定样品与对照所用的硫代硫酸钠溶液的毫升数, 并按下式计算样品中丙酮含量。

5. 计算:

$$\text{肝脏的丙酮含量 (毫摩尔/克)} = (A - B) \times N_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \times \frac{1}{6}$$

$A$  在上式中为滴定对照所消耗的 0.02 当量/升硫代硫酸钠溶液的毫升数。

$B$  为滴定样品所消耗的 0.02 当量/升硫代硫酸钠溶液的毫升数。

$N_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$  为标准硫代硫酸钠溶液浓度(当量/升)。

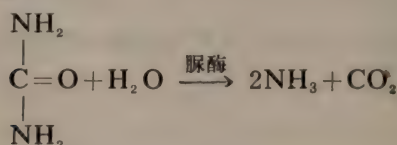
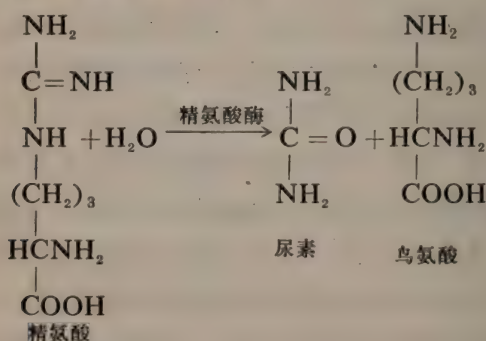
## 实验二十三 精氨酸酶的作用

### 一、目的:

观察肝组织的精氨酸酶活性。

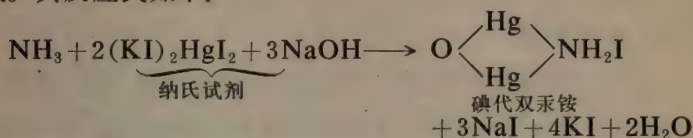
### 二、原理:

精氨酸酶催化精氨酸的水解,生成鸟氨酸和尿素。如借脲酶的作用,使尿素分解成二氧化碳和氨,再用纳氏试剂检定生成的氨,可间接得知精氨酸酶的活性。





纳氏试剂可与氨生成黄色的碘代双汞铵，故可用纳氏试剂检定氨。其反应式如下：



精氨酸酶的最适 pH 为 9.9，但在生理环境 pH 是 7.4 时，仍有很强的活性，而脲酶的最适 pH 为 7.0，所以本实验在 pH7.4 的缓冲液中进行。

### 三、器材：

1. Conway 氏扩散皿。
2. 剪子及镊子。
3. 匀浆器(或研钵)。
4. 吸管。

### 四、试剂和材料：

1. 大白鼠
2. 0.1 摩尔/升 pH7.4 磷酸盐缓冲液                      250 毫升
3. 0.02 当量/升硫酸溶液                                  80 毫升
4. 1% 精氨酸溶液    100 毫升
5. 脲酶制剂    80 毫升

1 克市售脲酶溶于 100 毫升 0.1 摩尔/升 pH7.4 磷酸盐缓冲液中，放冰箱保存。

6. 饱和碳酸钠溶液 (20°C 时碳酸钠的溶解度为 17.8 克)                      50 毫升
7. 纳氏 (Nessler's) 试剂①                                  80 毫升

---

① 纳氏试剂是具有腐蚀性的有毒试剂，因而应严格遵守有关毒品的操作规程。实验后应充分洗净它所沾污的一切器皿。

称取 5.8 克碘化汞和 4 克碘化钾溶于 25 毫升水中,再加入 25 毫升 6 当量/升的氢氧化钠溶液。如产生沉淀、静置片刻后将上部清液倒入具有橡皮塞的棕色瓶中,贮于暗处备用。

### 五、操作方法:

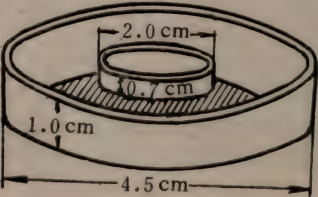
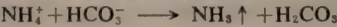
1. 肝匀浆的制备: 称取大白鼠鲜肝组织 1 克, 加 0.1 摩尔/升 pH7.4 磷酸盐缓冲液 2 毫升, 在玻璃匀浆器内打成匀浆, 再用缓冲液稀释至 30 毫升(或将称取的肝组织置于洁净研钵中, 加少量 0.1 摩尔/升 pH7.4 磷酸盐缓冲液研磨成糊状, 再用缓冲液稀释至 30 毫升)。混匀, 用纱布过滤, 收集滤液。

取肝匀浆 1 毫升置于试管中, 煮沸后冷却备用。

2. 取扩散皿<sup>①</sup>2 只, 做好标记, 在内室和外室按下表先后加入

试 剂	测 定 皿		对 照 皿	
	内室	外室	内室	外室
0.02当量/升硫酸(毫升)	1	—	1	—
pH7.4缓冲液(毫升)	—	1	—	1
1%精氨酸(毫升)	—	1.5	—	1.5
肝匀浆(毫升)	—	1	—	—
煮沸肝匀浆(毫升)	—	—	—	1
脲酶溶液(毫升)	—	1	—	1

① Conway 氏扩散皿由内外二室组成, 内室上沿较外室略低(见图)。实验时在外室中加入饱和碳酸钾(或碳酸钠)溶液后保温, 使其中的铵盐变成氨气逸出, 在一定时间内所扩散的氨可全部被内室所放置的酸液吸收。





各试剂(勿使内室和外室试剂相混! )。

在扩散皿的外室边沿涂上凡士林。盖好磨砂玻璃盖(磨砂面朝下),使其密封。将扩散皿放在桌面上并轻轻转动数次,使外室内容物混匀。然后放在 37°C 温箱中保温。半小时后取出。将盖移开一小角,将饱和碳酸钠 1 毫升加入外室中,立即加盖密封,轻轻在桌面上转动数次,混匀。再置于 37°C 温箱中保温,20 分钟后取出,各加纳氏试剂 1 毫升于内室中,比较测定皿及对照皿的颜色。

## 实验二十四 氨基移换反应(一)——

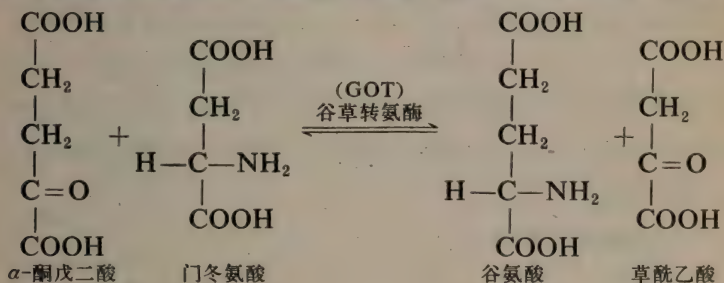
### 血液中转氨酶活力的测定(分光光度法)

#### 一、目的:

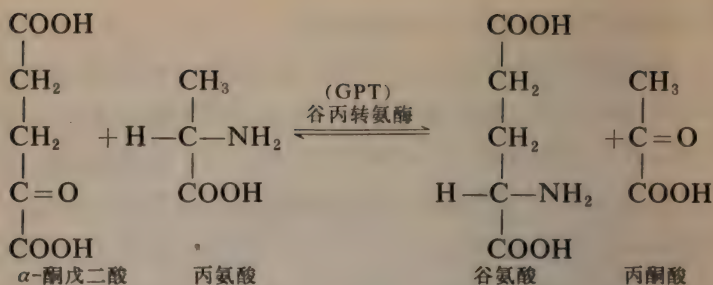
了解转氨酶在代谢过程中的重要作用及其在临床诊断中的意义,学习转氨酶活力测定的定理和方法。①

#### 二、原理:

生物体内广泛存在的氨基移换酶也称转氨酶,能催化  $\alpha$ -氨基酸的  $\alpha$ -氨基与  $\alpha$ -酮基酸的  $\alpha$ -酮基互换,在氨基酸的合成和分解尿素和嘌呤的合成等中间代谢过程中有重要作用。转氨酶的最适 pH 接近 7.4,它的种类甚多,其中以谷氨酸-草酰乙酸转氨酶(简称谷草转氨酶)和谷氨酸-丙酮酸转氨酶(简称谷丙转氨酶)的活力最



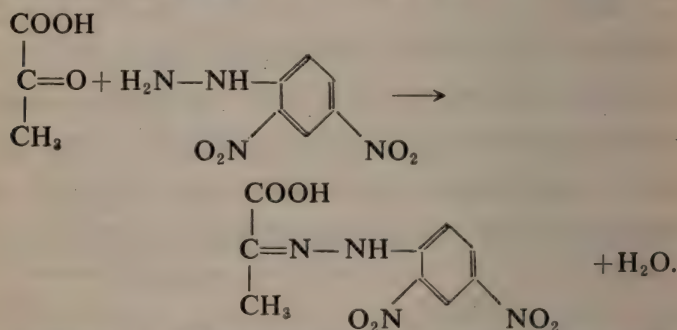
①本实验分两次完成。第一次制作标准曲线,第二次测酶活力和总结。



强。它们催化的反应如上。

正常人血清中只含有少量转氨酶。当发生肝炎，心肌梗死等病患时，血清中转氨酶活力常显著增加，所以在临床诊断上转氨酶活力的测定有重要意义。

测定转氨酶活力的方法很多，本实验采用分光光度法。谷丙转氨酶作用于丙氨酸和  $\alpha$ -酮戊二酸后，生成的丙酮酸与 2, 4-二硝基苯肼作用生成丙酮酸 2, 4-二硝基苯腙。



丙酮酸 2, 4-二硝基苯腙加碱处理后呈棕色，可用分光光度法测定。从丙酮酸 2, 4-二硝基苯腙的生成量，可以计算酶的活力。

### 三、器材：

1. 试管及试管架。
2. 吸管。
3. 恒温水浴。

#### 4. 分光光度计。

### 四、试剂和材料:

1. 0.1 摩尔/升磷酸缓冲液(pH7.4) 250 毫升

2. 2.0 微摩尔/毫升丙酮酸钠标准溶液 40—50毫升

取分析纯丙酮酸钠 11 毫克溶解于 50 毫升磷酸缓冲液内(当日配制)。

3. 谷丙转氨酶底物 150毫升

取分析纯  $\alpha$ -酮戊二酸 29.2 毫克, DL-丙氨酸 1.78 克置于小烧杯内, 加 1 当量/升氢氧化钠溶液约 10 毫升使完全溶解。用 1 当量/升氢氧化钠溶液或 1 当量/升盐酸调整 pH 至 7.4 后, 加磷酸缓冲液至 100 毫升。然后加氯仿数滴防腐。此溶液每毫升含  $\alpha$ -酮戊二酸 2.0 微摩尔, 丙氨酸 200 微摩尔。在冰箱内可保存一周。

4. 2,4-二硝基苯肼溶液 150 毫升

在 200 毫升锥形瓶内放入分析纯 2,4-二硝基苯肼 19.8 毫克, 加 100 毫升 1 当量/升盐酸。把锥形瓶放在暗处并不时摇动, 待 2,4-二硝基苯肼全部溶解后, 滤入棕色玻璃瓶内, 置冰箱内保存。

5. 0.4 当量/升氢氧化钠溶液 1,200 毫升

6. 人血清

### 五、操作方法:

1. 标准曲线的绘制: 取 6 支试管, 分别标上 0, 1, 2, 3, 4, 5 六个号。按下表所列的次序添加各试剂。

试剂 (毫升)	试 管 号					
	0	1	2	3	4	5
丙酮酸钠标准液	—	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25
谷丙转氨酶底物	0.50	0.45	0.40	0.35	0.30	0.25
磷酸缓冲液 (0.1摩尔/升, pH7.4)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10

2,4-二硝基苯肼可与有酮基的化合物作用形成苯腙。底物中的 $\alpha$ -酮戊二酸与2,4-二硝基苯肼反应,生成 $\alpha$ -酮戊二酸苯腙。因此,在制作标准曲线时,须加入一定量的底物(内含 $\alpha$ -酮戊二酸)以抵消由 $\alpha$ -酮戊二酸产生的消光影响。

先将试管置于37°C恒温水浴中保温10分钟以平衡内外温度。向各管内加入0.5毫升2,4-二硝基苯肼溶液后再保温20分钟,最后,分别向各管内加入0.4当量/升氢氧化钠溶液5毫升。在室温下静置30分钟,以0号管作空白,测定520毫微米的光吸收值。用丙酮酸的微摩尔数为横坐标,光吸收值为纵坐标,画出标准曲线。

2. 酶活力的测定: 取2支试管并标号,用第1号试管做为未知管,第2号试管做为空白对照管。各加入谷丙转氨酶底物0.5毫升,置于37°C水浴内10分钟,使管内外温度平衡。取血清0.1毫升加到第1号试管内,继续保温60分钟。到60分钟时,向两支试管内各加入2,4-二硝基苯肼试剂0.5毫升,然后再向第2号试管中加入0.4当量/升氢氧化钠溶液5毫升。在室温下静置30分钟后,测定未知管的520毫微米波长光吸收值(显色后30分钟至2小时内其色度稳定)。在标准曲线上查出丙酮酸的微摩尔数。(用1微摩尔丙酮酸代表1.0单位酶活力)。计算每100毫升血清中转氨酶的活力单位数。

## 实验二十五 氨基移换反应(二)—— 谷丙转氨酶活性的测定(纸层析法)

### 一、目的:

学习应用纸层析法鉴定氨基移换反应。

### 二、原理:



本实验观察肌肉糜中谷丙转氨酶所催化的氨基移换反应。在反应后借纸层析法检查底物谷氨酸的减少和产物丙氨酸的生成。为了防止丙酮酸被肌肉糜中其它的酶所氧化或还原，在反应系统中加入了抑制剂溴乙酸。

### 三、器材:

1. 解剖刀、剪刀、镊子。
2. 试管及试管架。
3. 吸管。
4. 离心管。
5. 离心机。
6. 培养皿。
7. 毛细管。
8. 喷雾器。
9. 圆形滤纸(直径 13 厘米)。
10. 吹风机。
11. 温箱。

### 四、试剂:

- |   |         |
|---|---------|
| 1. 1%谷氨酸溶液(用 1%氢氧化钾溶液中和)                  | 50 毫升   |
| 2. 1%丙酮酸钠溶液(用 1%氢氧化钾溶液中和)                 | 50 毫升   |
| 3. 0.1% 碳酸氢钾溶液                            | 25 毫升   |
| 4. 0.025% 一溴乙酸(或一碘乙酸)溶液<br>(用 1%氢氧化钾溶液中和) | 25 毫升   |
| 5. 2%醋酸溶液                                 | 20 毫升   |
| 6. 0.9%氯化钠溶液                              | 100 毫升  |
| 7. 扩展剂——酚的饱和水溶液                           | 1000 毫升 |

将 2 份酚和 1 份水(按重量计算)混合后,放入分液漏斗中。振荡。静止 24 小时以后分层,将下部酚层放到瓶中备用(可重复用

4次)。<sup>①</sup>

- |                   |        |
|-------------------|--------|
| 8. 显色剂            | 100 毫升 |
| 0.1% 水合茚三酮的正丁醇溶液。 |        |
| 9. 标准谷氨酸溶液(0.1%)  | 5 毫升   |
| 10. 标准丙氨酸溶液(0.1%) | 5 毫升   |
| 11. 1% 氢氧化钾溶液     | 100 毫升 |
| 12. 海砂            | 5 克    |

### 五、操作方法:

1. 肌肉糜制备;大白鼠肌肉 1 克,加入 0.9% 氯化钠溶液 3 毫升,再加海砂 200 毫克。在低温下研磨成细浆。离心(3000 转/分, 5 分钟)弃去沉淀,得肌肉糜提取液。

2. 向两个试管中各加入 0.5 毫升 1% 谷氨酸溶液, 0.5 毫升 1% 丙酮酸钠溶液, 0.5 毫升 0.1% 碳酸氢钾溶液和 0.25 毫升 0.025% 一溴乙酸溶液,混匀。然后分别加入肌肉糜提取液 0.5 毫升,混匀,立刻将第二支试管在沸水浴中加热 2—3 分钟做为对照管。

用塞子塞住这两支试管,同置 45°C 温箱中。保温 1.5 小时,并时时振荡内容物。

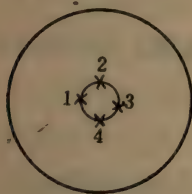
3. 保温完毕后,取出试管。各加 2% 醋酸溶液 4 滴,放沸水浴中 2 分钟使蛋白质完全沉下。过滤试管内容物,收集滤液,留待层析用。

4. 纸层析:取培养皿一个,加入酚水饱和液约 1 厘米(小心!酚有腐蚀性)。取圆形滤纸一张,在滤纸中心剪一小孔(直径约 1—2 毫米)并以圆心为中心约 1 厘米为半径划一圆做为底线。在此底线上,用铅笔点 4 个原点(等距离)。标明 1、2、3、4(见图)。用

---

<sup>①</sup> 新配制的酚扩展剂可以反复使用一周。

四根毛细玻璃管分别吸取以上两种滤液和标准的谷氨酸和丙氨酸溶液,依次点在滤纸上标明号码的原点处,用吹风机吹干后,再重复点样2—4次。注意四点的大小应尽量一致,其直径不应大于3毫米。然后将滤纸平放在含有饱和酚液的培养皿上。另取一滤纸小条卷成筒状,直径约为1—2毫米,将其下端剪成刷状。将此小筒插入滤纸中心小孔(不要突出于纸面上),使滤纸通过此小筒与酚溶液相连。(注意勿使滤纸的其它部份与酚溶液接触。)用大小相同的培养皿盖在滤纸上,此时酚溶液即由滤纸中心孔向四周扩展。



当酚溶液扩展到距离纸边缘约1.5厘米时(约需40—50分钟),取出滤纸。用铅笔划下酚溶液扩展之边缘,并用热风吹干。用喷雾器喷上小合茛三酮溶液,再用热风吹干。用铅笔圈下各显色点。测定各显色点的  $R_f$  值,由各点的  $R_f$  值分析实验结果。

## 第十三章 柱层析法的基本训练

### 实验二十六 用阳离子交换树脂摄取氯化钠

#### 一、目的:

通过用阳离子交换树脂摄取氯化钠的实验,学习离子交换层析法的原理和基本操作技术。

#### 二、原理:

离子交换层析法是利用各种离子对交换剂的亲合力程度不同而达到分离的方法。

本实验利用阳离子交换剂摄取氯化钠的作用,作为柱层析法的基本训练。

#### 三、器材:

1. 25 毫升碱滴定管。
2. 层析管(1 厘米×20 厘米)。
3. 1,000 毫升恒压洗脱瓶(可用分液漏斗或下口瓶代用。参见第三章图 3—1)。
4. 锥形瓶。
5. 烧杯。
6. 玻璃棒。
7. 吸管。

#### 四、试剂和材料:

1. 强酸型阳离子交换树脂: 磺酸型

各 200 克



### 弱酸型阳离子交换树脂(酚醛型)①

- |                            |                |
|----------------------------|----------------|
| 2. 10 毫克/毫升氯化钠溶液           | 240 毫升         |
| 3. 标准氢氧化钠溶液(浓度约为 0.1 当量/升) | 500 毫升         |
| 4. 酚酞指示剂                   | 30 毫升          |
| 5. 2 当量/升盐酸溶液              | 2,000—3,000 毫升 |
| 6. 2 当量/升氢氧化钠溶液            | 2000 毫升        |

### 五、操作方法: (参见第三章)

将干的强酸型树脂水浸过夜或搅拌 2 小时, 使充分溶胀, 再用 4 倍体积的 2 当量/升的盐酸浸泡 1 小时或搅拌半小时, 倾去清液, 洗至中性, 再用 2 当量/升的氢氧化钠溶液处理, 作法同上, 最后用 2 当量/升的盐酸如上法处理, 使成为氢型, 洗至中性待用。将氢型树脂装柱, 当柱的顶部快干的时候, 加入 10 毫升 10 克/升的氯化钠溶液, 使流入柱内。待溶液的弯月面正好在树脂的顶端时, 用水洗脱。收集 40 毫升洗脱液。用 0.1 摩尔/升标准氢氧化钠滴定收集的洗脱液。计算钠离子的交换率。

$$\text{Na}^+ \text{ 的交换率} = \frac{(NV)_{\text{NaOH}} \times 58.5\text{mg}}{6\text{ml} \times 10\text{mg/ml}} \times 100\%$$

$N$  = 标准氢氧化钠溶液的当量浓度。

$V$  = 滴定时所消耗标准氢氧化钠溶液的毫升数。

用弱酸型阳离子交换树脂重复以上实验, 并讨论实验结果。

---

① 也可以让一半学生使用强酸型离子交换树脂, 另一半学生使用弱酸型离子交换树脂, 然后比较实验结果。

## 第三篇 演示实验

### 实验二十七 聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳 (血清蛋白的分离)

#### 一、目的:

了解聚丙烯酰胺盘状电泳的基本原理和操作技术。

#### 二、原理:

聚丙烯酰胺凝胶是一种人工合成的凝胶,是由丙烯酰胺单体和少量交联剂在催化剂和加速剂的作用下发生聚合反应而制得的。

聚丙烯酰胺凝胶具有网状结构,其网眼的孔径可用改变凝胶液中单体的浓度来加以控制。一般分离蛋白质选用7.5%聚丙烯酰胺凝胶,分离比较大的分子,如核糖体核酸时则用2.5%凝胶。

凝胶电泳分辨力较高。

#### 三、器材:

1. 电泳仪(600V)及盘状电泳电泳槽。
2. 电泳玻璃管(用碱性较低的玻璃管),内径5—7毫米,长80—100毫米。
3. 玻璃架(制胶时用来垂直插放玻璃管)。
4. 微量注射器或微量吸管。
5. 带长针头的注射器。
6. 日光灯。
7. 带有玻璃珠或玻璃棒的一小段乳胶管。

#### 四、试剂和材料:

1. 血清。

2. 贮液和工作溶液: 按下表配制。

贮液及工作溶液的配制<sup>①</sup>

贮液	100 毫升溶液中的含量		pH	工作溶液混合比
1	1 当量/升盐酸	48.0毫升	8.9	小孔凝胶(分离胶)
	Tris	36.6克		1 份 1 号贮液
	TEMED	0.23毫升		2 份 2 号贮液
2	Acr	28.0克		1 份水
	Bis	0.753克		4 份 3 号贮液
3	过硫酸铵	0.14克		pH8.9, 凝胶浓度 7%
4	1 当量/升盐酸	约48毫升	6.7	大孔凝胶
	Tris	5.98克		(浓缩胶、样品胶)
	TEMED	0.46毫升		1 份 4 号贮液
5	Acr	10.0克		2 份 5 号贮液
	Bis	2.5克		1 份 6 号贮液
6	核黄素	4.0毫升		4 份 7 号贮液
7	蔗糖	40.0克		pH6.7, 凝胶浓度 2.5%
电极缓冲液			8.3	用时稀释 10 倍
	Tris	6.0克		
	甘氨酸	28.8克		
	加水到 1 升			

① 贮液放冰箱中一般可保存 1—2 月, 3 号贮液只能保存一周。如有不溶物要过滤。

表中试剂: Acr——丙烯酰胺;

Bis——甲叉双丙烯酰胺;

TEMED——四甲基乙二胺;

Tris——三羟甲基氨基乙烷。

## 五、操作方法<sup>①</sup>:

一般先制分离胶, 再在分离胶上面制作浓缩胶。

### 1. 分离胶的制备

将贮液由冰箱取出等达到室温后再按上表中的比例配制工作溶液。先将分离胶液与过硫酸铵分别放在真空干燥器中。待抽出溶解的空气后取出, 赶快混匀, 用带长针头的注射器吸取一定量的胶液, 沿着管壁加到预先准备好的玻璃管中(玻璃管的一端用带有玻璃珠或小段玻璃棒的乳胶管塞住, 在乳胶管中加二滴 40% 蔗糖后插在玻璃架上), 灌入的分离胶液高约 6.5 厘米, 然后立即用带弯针头的小注射器在已加入的分离胶液面上, 距胶面约 0.1 厘米处沿管壁缓缓加入 3—5 毫米高的蒸馏水层, 切忌使加入之水呈滴状坠入胶液, 这样会使顶部凝胶浓度变稀, 改变凝胶孔径。

水层放好后, 静置胶液使进行聚合反应。正常情况下 10 分钟开始聚合, 应控制在 30 分钟到 1 小时内完成聚合。

刚加水时看出有界面, 后逐渐消失。等到再看出界面时表明凝胶已经聚合, 再静置 30 分钟使聚合完全。

### 2. 浓缩胶的制备

用注射器吸去分离胶上的水层, 用滤纸条吸去残留的水液(滤纸不要接触胶面)。

按比例混匀浓缩胶液(也预先抽气, 抽气时不要与核黄素混合, 抽完气后再混合), 先用这种胶液很快漂洗一下分离胶的顶部, 除去漂洗液后, 按上法加入浓缩胶液约 0.5—1 厘米高, 并立即仔细加水层。然后在距管 10 厘米处用日光灯照射进行光聚合。正常情况下照射 6—7 分钟就可看到浓缩胶显乳白色, 表明聚合开

---

<sup>①</sup> 演示时, 教师可事先做好胶管, 演示上样, 电泳, 剥胶, 固定染色。



始。继续照半小时，使聚合完全。

除去水层，吸干后用上电极槽缓冲液洗涤，再将这种缓冲液加至管顶，在室温放置 0.5—1 小时就可使用。

浓缩胶应在临用前再制备。

### 3. 加样

盘状电泳所需样品很少，用 1 毫克/毫升浓度的样品液每管需 5—100 微升。

加样前先把玻璃管下边的橡胶塞除去，要注意先拉开乳胶管使空气进入，再拔下来，防止将凝胶拉坏。下槽中放满缓冲液，把管固定在上槽的洞中，要保证凝胶管垂直和橡皮塞孔密封不漏。管的下端悬上一滴缓冲液，再把上槽放在下槽上，避免管下有气泡。管中凝胶表面上部及上槽灌满电极缓冲液。

将 4 号贮液 1 份，水 3 份，20% 蔗糖溶液 4 份，混和，然后取血清 3 微升，加上述混合液 0.15 毫升，混匀后小心地加在浓缩胶与电极缓冲液界面处，因样品液比重大，即平铺在凝胶表面。

指示染料一般用溴酚蓝或酚红，通常每管加 0.1% 的染料溶液 0.005 毫升，指示染料与样品混合后加入。

### 4. 电泳

加完样后接通电源，负极在上，正极在下。调节电流，开始时用 1—2 毫安/管，电泳 1—2 分钟，再升高电流到约 3—5 毫安/管，不要一开始电流很高。电流最好不超过 5 毫安，以免产热过多，必要时应进行冷却或在冷库内进行。

当指示染料迁移到凝胶柱的下端附近时就可停止电泳，关闭电源，取出玻管。

缓冲液可再行使用，但上下槽缓冲液不能混淆，因下槽缓冲液中已混入催化剂及氯离子(快离子)，如将它当作上槽液就要影响电泳效果。

## 5. 凝胶的取出

将一针头长约 10 厘米的注射器吸满水。将针头插入凝胶与管壁之间,并紧贴管壁,一面注入水一面慢慢旋转玻管并推针前进,靠水流压力和润滑作用使玻管内壁与凝胶分开,待水从玻管一端流出时,再慢慢将针头退出。然后去掉针头,用注射器向玻管中快速注射水,将凝胶压出玻管。如凝胶浓度较高,取出困难,可用 10% 的甘油水溶液代替水注入。一般剥胶方向是从浓缩胶端开始。

## 6. 固定

为防止凝胶柱内已分离成分的扩散,需进行固定。方法是:把剥出的凝胶柱浸泡在 7% 乙酸或 12.5% 三氯乙酸的水溶液中几分钟;或浸泡在用 7% 乙酸或 12.5% 三氯乙酸液配制的染色液中,同时进行固定和染色。

## 7. 染色

染色的操作过程见下表。

蛋白质的染色法

方 法	固 定	染 液	染色时间	脱 色
氨基黑 —10 B	甲醇	用 0.1 当量/升氢氧化钠配制的 1% 氨基黑	5 分钟(室温)	5% 乙醇
	7% 乙酸	用 7% 乙酸配制的 0.5—1% 氨基黑	2 小时(室温)	7% 乙酸
			10 分钟(96°C)	
考马斯蓝 R 250	20% 磺基水杨	0.25% R 250 水液	5 分钟(室温)	7% 乙酸
	10% 三氯乙酸 含尿素的在	10% 三氯乙酸和 —1% R 250 19:1 (V/V)	0.5 小时(室温)	10% 三氯乙酸
	5% 三氯乙酸	5% 磺酸水杨酸和 1% R 250 19:1	1 小时(室温)	90% 甲酸
考马斯蓝 G 250	6% 乙酸	6% 乙酸中 1% G 250	10 分钟(室温)	甲醇-水-浓氨水
	12.5% 三氯乙酸	12.5% 三氯乙酸中 0.1% G 250	30 分钟(室温)	64:36:1

续 表

方 法	固 定	染 液	染色时间	脱 色
Fonceau 3 R	12.5%三氯乙酸	0.1N NaOH中1% 3R	2 分钟(室温)	5% 乙醇
固 绿	7% 乙酸	7% 乙酸中1% 固绿	2 小时(5°C)	7% 乙酸
氨基萘酚 磺酸	2 当量/升盐酸 浸几秒钟	0.1M 磷酸盐缓冲液 pH6.8中0.003% 染料	3 分钟	

## 实验二十八 离子交换柱层析法分离氨基酸

### 一、目的:

学习用阳离子交换树脂柱分离氨基酸的操作方法和基本原理。

### 二、原理:

各种氨基酸分子的结构不同,在同一pH 时与离子交换树脂的亲合力有差异,因此可依亲和力从小到大的顺序被洗脱液洗脱下来,达到分离的效果。

### 三、器材:

1. 层析管: 20 厘米×1 厘米。
2. 试管。
3. 吸管。
4. 恒压洗脱瓶。
5. 部分收集器。
6. 塘磁杯。
7. 电炉。
8. 分光光度计。

#### 四、试剂与材料:

##### 1. 苯乙烯磺酸钠型树脂

(强酸  $1 \times 8$ , 100—200 目, 可用上海华东化工学院产品)。

##### 2. 2 当量/升盐酸溶液。

##### 3. 2 当量/升氢氧化钠溶液。

##### 4. 标准氨基酸溶液。

天冬氨酸、赖氨酸和组氨酸均配制成 2 毫克/毫升的 0.1 当量/毫升盐酸溶液。

##### 5. 混合氨基酸溶液

将上述天冬氨酸、赖氨酸和组氨酸各溶液按 1:2.5:10 的比例混合<sup>①</sup>。

6. 柠檬酸-氢氧化钠-盐酸缓冲液 (pH5.8, 钠离子浓度 0.45 当量/升): 取柠檬酸( $C_6O_7H_8 \cdot H_2O$ ) 14.25 克、氢氧化钠 9.30 克和浓盐酸 5.25 毫升溶于少量水后, 定容至 500 毫升, 冰箱保存。

##### 7. 显色剂

2 克水合茚三酮溶于 75 毫升乙二醇单甲醚中, 加水至 100 毫升。

8.50% 乙醇水溶液。

#### 五、操作方法:

##### 1. 层析柱的准备:

将强酸型阳离子交换树脂用氢氧化钠处理成  $Na^+$  型后洗至中性(处理方法见实验二十六); 搅拌一小时后装成一个直径 1 厘米, 高 16—18 厘米的层析柱。

##### 2. 氨基酸的洗脱:

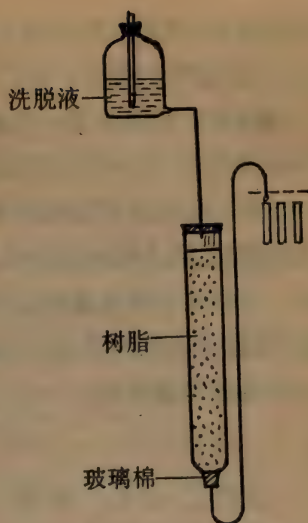
用 pH5.8 的柠檬酸缓冲液流洗平衡交换柱(装置如图)。调

---

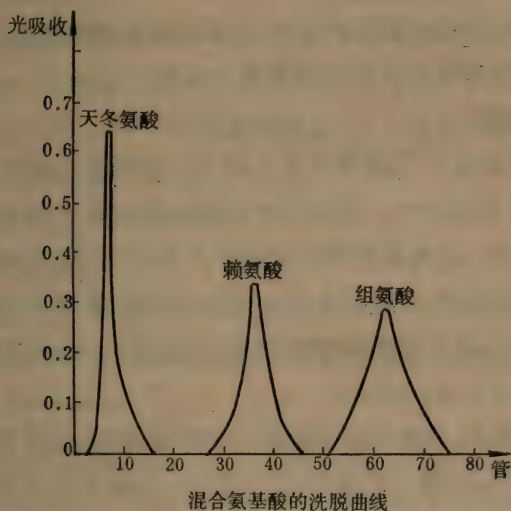
① 若仅在显色后让学生目测观察结果, 可以采用三种氨基酸的等体积混合溶液作样品, 上样量可略微增大。



节流速为 0.5 毫升/分, 流出液达床体积的四倍时即可上样。由柱上端仔细加入氨基酸混合液 0.25—0.5 毫升, 同时开始收集流出液。当样品液弯月面靠近树脂顶端时, 即刻加入 0.5 毫升柠檬酸缓冲液冲洗加样品处。待缓冲液弯月面靠近树脂顶端时, 再加入 0.5 毫升缓冲液。如此重复二次, 然后用滴管小心注入柠檬酸缓冲液 (切勿搅动床面) 并将柱与洗脱瓶和部分收集器相连。开始用试管



离子交换柱层析分离氨基酸



层析柱高 18 厘米, 操作压 72 厘米, 流速 0.5 毫升/分, 收集量 1 毫升/管。室温 15°C, 上样量: 天冬氨酸 0.04 毫克, 赖氨酸 0.1 毫克, 组氨酸 0.4 毫克, 即取混合氨基酸 (1:2.5:10V/V) 0.27 毫升。

收集洗脱液,每管收集 1 毫升,共收集 80 管左右。

### 3. 氨基酸的鉴定:

向各管收集液中加 1 毫升水合茚三酮显色剂并混匀,在沸水浴中准确加热 15 分钟后冷却至室温,再加 1.5 毫升的 50% 乙醇溶液。放置 10 分钟。以收集液第二管为空白,测定 570 毫微米波长的光吸收值。以光吸收值为纵坐标,以洗脱体积为横坐标绘制洗脱曲线。以已知三种氨基酸的纯溶液为样品,按上述方法和条件分别操作;将得到的洗脱曲线与混合氨基酸的洗脱曲线对照,可确定三个峰为何种氨基酸。

## 实验二十九 凝胶过滤法测定蛋白质分子量

### 一、目的:

1. 学习凝胶过滤法的工作原理和基本操作技术。
2. 学习用凝胶过滤法测定蛋白质的分子量。

### 二、原理:

凝胶过滤是广泛应用于蛋白质、酶、核酸等生物高分子的分离分析的有效方法之一,它是以被分离物质的分子量差异为基础的一种层析方法。此类层析的固相载体是具有分子筛作用的凝胶。目前使用较多的是具有各种孔径范围的葡聚糖凝胶(商品名为 Sephadex),其它还有聚丙烯酰胺凝胶(商品名为 Biogel)以及琼脂糖凝胶(商品名为 Sepharose)。

葡聚糖凝胶是由一定平均分子量的葡聚糖(右旋糖)和甘油基以醚桥 ( $\text{—O—CH}_2\text{—CH—CH}_2\text{—O—}$ ) 形式相互交联形成的三

|  
OH

维空洞网状结构。是一种不溶于水的物质。通过控制交联剂环氧氯丙烷和葡聚糖的配比以及交联时的反应条件可控制交联度而获得

具有不同“网眼”的凝胶。“网眼”的大小决定了被分离物质能够自由出入凝胶内部的分子量范围。它们可分离的分子量从几百到数十万不等。凝胶过滤法测定蛋白质分子量的原理参见第三章(五)。

### 三、器材:

1. 层析柱: 直径2—2.5厘米, 长 50—60 厘米或直径 0.9—1.2 厘米长 100—150 厘米的玻璃管, 要求内水体积大于 100 毫升。本实验采用直径 1.5 厘米长 65 厘米的玻璃管。玻管下端有一合适的胶塞, 胶塞中央插一输血针头(截去庞大的端部)。胶塞上置一与柱内径同样大小的人造丝或尼龙丝填片。2. 恒压瓶。3. 部分收集器。4. 紫外及可见光分光光度计。5. 细长滴管。6. 锥形瓶。7. 内径稍小于层析柱的长玻璃管。

### 四、试剂:

1. 葡聚糖凝胶 G200
2. 0.9%氯化钠溶液
3. 蓝葡聚糖 2000
4. 标准样品: 细胞色素 c(市售针剂亦可, 分子量 11,700)、卵清蛋白(分子量 43,000) 牛血清清蛋白(分子量 68,000),  $\gamma$ -球蛋白(分子量 165,000)。
5. 未知样品: 核糖核酸酶

### 五、操作方法: ①

1. 凝胶溶胀: 根据预计的总床体积和所用干胶的床体积, 称出所需干凝胶, 放入 250 毫升锥形瓶中, 并根据其得水值加入适量

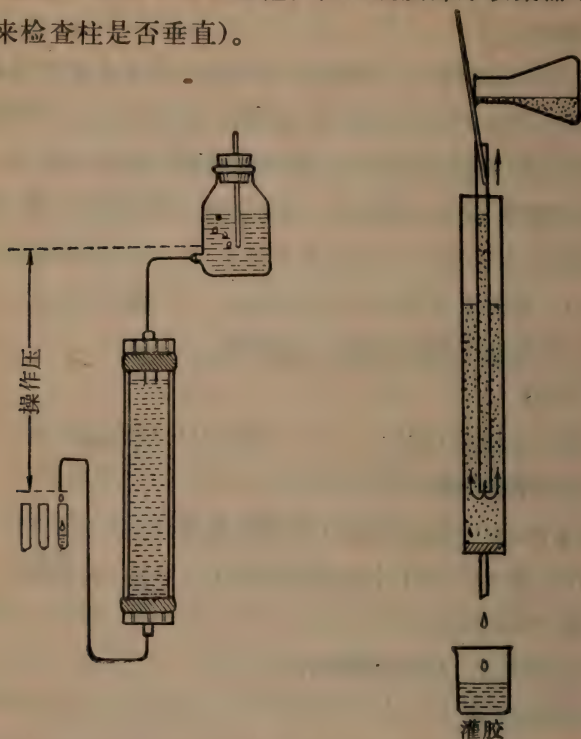
---

① 本实验所用时间较长, 教师可事先装好柱, 并用 0.9% 的 NaCl 进行流洗平衡。演示时可仅演示本实验一部份内容, 如先上样[样品可用蓝葡聚糖(蓝色)或细胞色素 c(红色)这样学生便于观察], 再讲解原理及实验过程, 最后将洗脱液进行比色, 标出本样品的洗脱体积。

也可用蓝葡聚糖(10 毫克/毫升)与重络酸钾(20 毫克/毫升)混合液 0.5 毫升上样, 然后观察红色区带与黄色区带的分离。从而了解葡聚糖凝胶对大小不同分子的分离作用。

的蒸馏水(水可略多一些),然后置于沸水浴中煮沸 5 小时,冷却至室温。

2. 装柱: 按照下图安装柱、恒压瓶及部分收集器(可以悬挂一垂线来检查柱是否垂直)。



凝胶过滤装置

装柱前将溶胀的凝胶减压抽气 10 分钟以除尽气泡。

在柱内先注入  $1/5-1/4$  的水,再插入一根直径稍小的长玻璃管,一直到柱的底部,然后轻轻搅动凝胶(切勿搅动太快,以免空气再逸入),使形成均一的薄胶浆,并立即沿玻璃棒倒入长玻璃管内。待凝胶开始沉降时打开出口,并缓缓提起长玻璃管。以后一边灌凝胶,一边提升玻璃管(长玻璃管的作用是可以减少器壁效应以使柱装得比较均匀。),直至液体充满整个柱时再将玻璃管抽出。柱要一次装完,不



能间歇。如抽出玻管后凝胶尚未倒完，则不待凝胶完全沉降形成胶面时就吸出上部清液；用玻棒轻轻搅动上部凝胶，再继续加入凝胶，如此重复，直至完全装好为止。待凝胶沉降后放置 15—20 分钟，与盛有 0.9% 氯化钠溶液的恒压洗脱瓶连接，开始流动平衡。此时流速不能太大，必须低于层析时所需的速度，在平衡过程中逐渐增加到层析时的速度。一般用 3—5 倍总床体积的洗脱液流过柱就可以了。

### 3. 柱的检验及测定外水体积

称取 2—3 毫克蓝葡聚糖 2000 溶于 0.4 毫升 0.9% 氯化钠溶液中。

将凝胶床面上的液体吸掉，面上留下一些液体从柱的出口流出。等到凝胶床面上的液体正好流干时，用滴管将蓝葡聚糖加到凝胶床面上，注意不要破坏床面。要从床面中央开始加，逐渐转到外围；要避免沿柱壁滴加，以免样品从柱壁滑下（加完后如不够均匀，可用玻棒浅浅地、缓缓地搅动床面）。待其正好流干时再加少量 0.9% 氯化钠溶液，等到流干后再加 0.9% 氯化钠溶液，使床面上液体高度不小于 5 厘米。这样滴入洗脱液时不会冲动凝胶床面。然后接上洗脱瓶进行洗脱。同时用部分收集器收集洗脱液（上完样后立即开始收集），流速控制在 1 毫升/2—3 分钟。注意观察蓝色区带向下移动的情况，如前沿平齐，区带均匀，说明柱是均匀的，可以使用。

在蓝葡聚糖全部流出柱后，用 610 毫微米波长测定各管之光吸收值，其洗脱体积（至峰值管的洗脱液体积）即为柱的外水体积。

### 4. 标准曲线的制作<sup>①</sup>

① 标准曲线的测定方法有两种。一种是上柱样品中一次包括几个标准蛋白质，洗脱后分出相应的几个峰。根据峰顶端的洗脱体积算出各标准蛋白质的  $V_e/V_0$ ，这样一次走柱就能测出一条标准曲线。将已知的蛋白质走完后，再在混合样品中加入未知样品，走柱后出现的新峰就属于未知样品。这种方法叫做内插法。另一种方法是走柱一次测定一个标准蛋白质，经几次走柱画出标准曲线，然后再测未知样品。这种方法叫做外插法。本实验采用外插法。

称细胞色素c、卵清蛋白、牛血清清蛋白及 $\gamma$ -球蛋白各2—3毫克,分别溶于0.4—0.5毫升0.9%氯化钠溶液中,然后如洗脱蓝葡聚糖那样分别上样、洗脱、收集,并用230毫微米测定(细胞色素c也可用410毫微米测定)。求出 $V_e$ 。如用280毫微米测定则样品应为5毫克。

画出洗脱曲线,算出每一种蛋白质的 $V_e/V_0$ ,然后以 $V_e/V_0$ 对 $\lg M$ 作图。

#### 5. 未知样品的测定

称取未知样品2—3毫克,溶于0.4—0.5毫升0.9%氯化钠溶液中。用同样方法,测出其 $V_e$ ,计算 $V_e/V_0$ ,再在图上找出对应的 $\lg M$ 值,从而求出 $M$ 。

## 实验三十 血红蛋白的两性解离

### 一、目的:

证明蛋白质为两性电解质。

### 二、原理:

蛋白质为两性电解质。其解离状态和解离程度受酸碱条件的影响。可以通过血红蛋白在电场中的行为证明(血红蛋白的等电点是6)。

### 三、器材:

1. 2个U形玻璃管(直径1.5—2.0厘米,两端圆心距离为5厘米)。
2. 4条铂丝(直径0.5厘米,长12—13厘米,)其浸入溶液的一端折成8—10个螺旋共约1厘米长。
3. 1或2台直流整流器。
4. 4条导线(红色2条,黑色两条)。

5. 1 个铁架台。
6. 2 个铁试管夹。
7. 2 个双顶丝。
8. 1 块白色挡板。

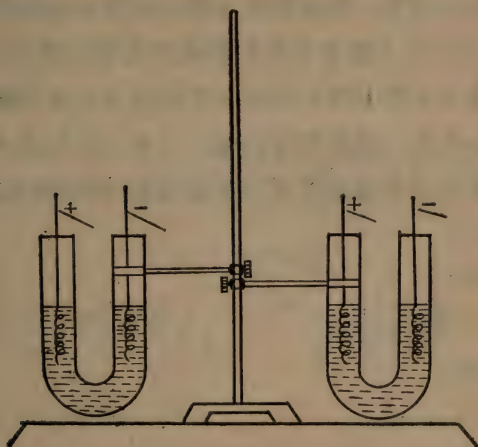
#### 四、试剂及材料:

1. 0.2 当量/升盐酸溶液
2. 0.2 当量/升氢氧化钠溶液
3. 全血(放冰箱中可保留旧)4.5%柠檬酸钠溶液

#### 五、操作方法:

1. 将 0.8 毫升全血放在 100 毫升量筒中, 用水稀释至 80 毫升。混匀后, 取其中 40 毫升转移至另一量筒中。向两个量筒中分别加入 0.75 毫升 0.2 当量/升的盐酸溶液及 0.2 当量/升的氢氧化钠溶液并混匀。

2. 将两个 U 形管固定在铁架台上。把酸化的血液和碱化的血液分别转移至两个 U 形管中。在 U 形管的两端插入铂电极。铂电极的下端应浸入溶液。铂电极通过导线与整流器相接。联接



方式见图。

3. 当电压为 250V、电流为 20mA 时,约 10 分钟左右血稀释液在电场中有明显的流动。酸管阳(正)极端的血液逐渐明亮起来,另一极出现棕色沉淀,而碱管发亮的一端出现在阴(负)极<sup>①</sup>,这说明血红蛋白在酸性条件下解离成阳离子,在电场中移向阴极;在碱性条件下解离成阴离子,在电场中移向阳极。血红蛋白因酸碱条件不同可以解离成带有不同电荷的离子因而是两性电解质。

## 实验三十一 紫外分光光度法测定核酸的含量

### 一、目的:

1. 了解紫外分光光度计的基本原理和使用方法。
2. 学习用紫外分光光度法测定核酸含量的原理和操作方法。

### 二、原理:

核酸、核苷酸及其衍生物都具有共轭双键系统,能吸收紫外光。RNA 和 DNA 的紫外吸收高峰在 260 毫微米波长处。一般在 260 毫微米波长下,每毫升含 1 微克 DNA 溶液的光吸收值约为 0.020,每毫升含 1 微克 RNA 溶液的光吸收值为 0.022。故测定未知浓度 RNA 或 DNA 溶液 260 毫微米的光吸收值即可计算出其中核酸的含量。此法操作简便,迅速。若样品内混杂有大量的核苷酸或蛋白质等能吸收紫外光的物质,则测定误差较大,故应设法事先除去。

### 三、器材:

1. 分析天平。
2. 离心机。

---

① 如在 U 形管后衬白色挡板则观察效果更为明显。



3. 容量瓶。
4. 紫外分光光度计
5. 吸管。
6. 冰浴或冰箱。

#### 四、试剂:

1. 5—6% 氨水

2. 钼酸铵-高氯酸试剂 (沉淀剂): 如配制 200 毫升可在 193 毫升蒸馏水中加入 7 毫升 70% 高氯酸和 0.5 克钼酸铵。

#### 五、操作方法:

1. 用分析天秤准确称取待测的核酸样品 500 毫克, 加少量蒸馏水调成糊状; 再加入少量的水稀释。然后用 5—6% 氨水调至 pH7, 定容到 50 毫升。

2. 取两支离心管, 向第一支管内加入 2 毫升样品溶液和 2 毫升蒸馏水; 向第二支管内加入 2 毫升样品溶液和 2 毫升沉淀剂, 以除去大分子核酸作为对照。混匀。在冰浴或冰箱中放置 30 分钟后离心 (3000 转/分, 10 分钟)。从第一第二管中分别吸取 0.5 毫升上清液, 用蒸馏水定容到 50 毫升。用光程为 1 厘米的石英比色杯, 于 260 毫微米波长处测其光吸收值 ( $A_1$  和  $A_2$ )。

#### 六、计算:

$$\text{DNA(RNA) \%} = \frac{\frac{A_1 - A_2}{0.020 (\text{或 } 0.022)} (\text{微克/毫升})}{\text{样品浓度 (微克/毫升)}} \times 100$$

(A 表示光吸收值)

$$\begin{aligned} \text{样品浓度} &= \frac{500 \text{ 毫克}}{50 \times \frac{4}{2} \times \frac{50}{0.5} \text{ 毫升}} = \frac{0.5 \times 10^6 \text{ 微克}}{10^4 \text{ 毫升}} \\ &= 50 \text{ 微克/毫升} \end{aligned}$$

如果已知待测的核酸样品不含酸溶性核苷酸或可透析的低聚

多核苷酸，即可将样品配制成一定浓度的溶液（20—50 微克/毫升）在紫外分光光度计上直接测定。

## 实验三十二 透析实验(一)——蛋白质的透析

### 一、目的:

学习透析的基本原理和操作。

### 二、原理:

蛋白质是大分子物质，不能透过透析膜而小分子物质可以自由透过。

在分离提纯蛋白质的过程中，常利用透析的方法使蛋白质与其中夹杂的小分子物质分开。

### 三、器材:

1. 透析管或玻璃纸。
2. 烧杯。
3. 玻璃棒。
4. 电磁搅拌器。
5. 试管及试管架。

### 四、试剂:

1. 蛋白质的氯化钠溶液

三个除去卵黄的鸡卵蛋清与 700 毫升水及 300 毫升饱和氯化钠溶液混合后，用数层干纱布过滤。

2. 10% 硝酸溶液
3. 1% 硝酸银溶液
4. 10% 氢氧化钠溶液
5. 1% 硫酸铜溶液

### 五、操作方法:

1. 用蛋白质溶液作双缩脲反应(见实验三)。

2. 向火棉胶制成的透析管中装入 10—15 毫升蛋白质溶液并放在盛有蒸馏水的烧杯中。(作法见第三章,或用玻璃纸装入蛋白质溶液后扎成袋形,系于一横放在烧杯的玻璃棒上)。

3. 约 1 小时后,自烧杯中取水 1—2 毫升,加 10% 硝酸溶液数滴使成酸性,再加入 1% 硝酸银溶液 1—2 滴,检查氯离子的存在。

4. 从烧杯中另取 1—2 毫升水,做双缩脲反应,检查是否有蛋白质存在。

5. 不断更换烧杯中的蒸馏水(并用电磁搅拌器不断搅动蒸馏水)以加速透析过程。数小时后从烧杯中的水中不再能检出氯离子。此时停止透析并检查透析袋内容物是否有蛋白质或氯离子存在。(此时应观察到透析袋中球蛋白沉淀的出现,这是因为球蛋白不溶于纯水的缘故。)

## 实验三十三 透析实验(二)——糖类的透析

### 一、目的:

了解透析作用的原理和操作。

### 二、原理:

淀粉含有两种大分子: 分子量为 50,000 的直链淀粉和分子量为  $1 \times 10^6$  的支链淀粉,它们都不能透过透析膜。唾液淀粉酶可以催化淀粉水解生成分子量为 360、具有还原性的麦芽糖,可透过透析膜扩散到透析液中。

### 三、器材:

1. 透析管(约宽 2.5 厘米,长 12—15 厘米)。
2. 吸管。
3. 100 毫升烧杯。

4. 滴管。

5. 试管。

#### 四、试剂与材料:

1. 2%可溶性淀粉溶液

2. 0.02 摩尔/升 pH6.8 的磷酸缓冲液

3. 氯化钠溶液

0.3 克氯化钠溶于 100 毫升 pH6.8, 0.02 摩尔/升 磷酸缓冲液中。

4. 唾液

用蒸馏水漱口后, 含一口蒸馏水, 1—2 分钟后吐出。

5. 碘液

配法见实验十二。

6. Benedict 试剂。

配法见实验十二。

#### 五、操作方法<sup>①</sup>:

准备两个下端已扎紧的透析袋(透析袋的处理法见第二章), 各装入 5 毫升可溶性淀粉溶液和 1 毫升氯化钠溶液。然后向一个透析袋中加入 2 毫升唾液作为“样品”袋, 向另一袋中加入 2 毫升蒸馏水作为对照(注意避免唾液溅入此袋中)。将袋的上端扎紧, 来回颠倒数次, 使内容物混匀。然后置于盛有 100 毫升磷酸缓冲液的烧杯中进行透析, 并不时搅拌(或连接电磁搅拌器)。

每间隔适当时间(15—30 分钟), 从烧杯中取少许透析液用碘液检查淀粉的存在, 用 Benedict 试剂检查麦芽糖的存在(方法见实验十二)。

最后(约 1.5 小时后)取出透析袋中内容物并检查其中淀粉和

---

<sup>①</sup> 本实验可在实验十二中演示。



麦芽糖的存在。

## 实验三十四 锂盐存在时蔗糖的燃烧

### 一、目的:

直观地认识一般催化剂的催化作用。

### 二、原理:

能够改变化学反应速度，而本身在反应前后的化学组成和数量保持不变的物质叫催化剂。一般所说的催化剂是加快反应速度的物质。现在以锂盐对蔗糖氧化作用的影响作为催化作用的一个实例进行演示。

### 三、器材:

1. 坩锅钳。
2. 酒精灯。

### 四、操作:

用钳子取普通食用的蔗糖块，放在酒精灯火焰上。蔗糖不会燃烧，只是逐渐地熔化和炭化。如果把撒上碳酸锂的蔗糖块放在酒精灯焰上，由于锂盐对蔗糖氧化的催化作用，使蔗糖以明显的红色火焰燃烧。

## 实验三十五 用铂和血液过氧化氢酶 分解过氧化氢。

### 一、目的:

比较生物催化剂——酶与无机催化剂的活性，直观地认识到酶的催化效率极高。

### 二、原理:

在通常温度下，过氧化氢分解成水和氧气的反应进行得很缓

慢。但是,在少量的铂黑或血(含过氧化氢酶)存在时,这个反应就被大大地加速了。同时,可以看出酶的催化活性比无机催化剂的催化活性还要高出很多倍。

### 三、器材:

1. 150 毫升锥形瓶。
2. 50 毫升量筒。
3. 试管。
4. 0.5 毫升吸管。
5. 解剖刀。

### 四、试剂和材料:

1. 动物血液。
2. 10%过氧化氢溶液。
3. 铂黑。

将 0.5 克四氯化铂溶解在 0.5 毫升蒸馏水中,并向此溶液中加入 0.7 毫升 40% 甲醛溶液。然后,在冷却条件下逐渐加入氢氧化钠溶液(0.5 克氢氧化钠溶解在 1 毫升蒸馏水中),先在冷水中放置 30 分钟,再在 55°C 水浴中放置 15 分钟。然后将溶液振摇 3—5 分钟,即有絮状沉淀产生。用倾泻法倒出上清液,向沉淀中加入少量的水和醋酸,直到有强烈的醋酸味为止。沉淀被溶解后又重新出现,用倾泻法将上清液倒出。用蒸馏水洗涤沉淀两次。将沉淀转移到玻璃皿上,用滤纸将液体尽量吸干。最后将沉淀真空干燥或放在室温下逐渐干燥。

### 五、操作:

量取 40—50 毫升 10% 过氧化氢溶液,分别加到两个 150 毫升锥形瓶中,然后用解剖刀尖端取少量(约 0.2 毫克)铂黑加入一个锥形瓶中,向另一个瓶中加入 0.5 毫升血液。

在铂黑作用下,锥形瓶中的过氧化氢发生迅速的分解,出现大

量的气泡，好似液体沸腾一样。第二个锥形瓶中的过氧化氢在过氧化氢酶的作用下发生强烈的分解，迅速出现大量泡沫，而且白色泡沫由液面升起。

## 实验三十六 肝组织耗氧量的测定

### 一、目的：

学习肝组织耗氧量的测定方法及 Warburg 氏呼吸计的原理和操作。

### 二、原理：

鼠肝组织在呼吸过程中摄入氧气放出二氧化碳。将肝匀浆放入 Warburg 氏呼吸计的反应瓶中时，如使放出的  $\text{CO}_2$  被氢氧化钾溶液吸收，则其耗氧量在温度和体积固定的条件下表现为压力的变化，可以测定（参见第七章）。

### 三、器材：

1. Warburg 氏呼吸器一套（包括反应瓶体积已知的压力计 3 支，零点定在 250 毫米）。

2. 解剖器一套

### 四、试剂和材料：

1. 大白鼠

2. 生理盐溶液

将 0.9% 氯化钠溶液 100 毫升，1.15% 氯化钾溶液 4 毫升，0.11 摩尔/升氧化钙溶液 3 毫升，0.154 摩尔/升硫酸镁溶液 1 毫升和 pH 7.3，0.1 摩尔/升的磷酸盐缓冲液 21 毫升混合。注意最后加入镁盐，要边搅拌边加入，以防止局部过浓出现沉淀。溶液 pH 也要准确，偏碱亦会发生沉淀。

3. 10% 氢氧化钾溶液

#### 4. 羊毛脂

#### 5. Brodie 溶剂

23 克氯化钠, 5 克胆酸钠和 100 毫克伊文氏蓝溶于 500 毫升水中, 并加入 1—2 粒麝香草酚结晶防腐。如放入密闭的瓶中, 可在冰箱中长期保存。

### 五、操作方法:

1. 向 Warburg 氏呼吸计的水槽内加入温水并调节到所需温度( $37^{\circ}\text{C}$ )。开动搅拌器, 检查调热器, 使其处于正常运转状态。

2. 准备已知反应瓶体积(零点为 250 毫米)的干燥洁净的压力计三支, 将其三通活塞涂好羊毛脂后固定在特殊的架子上。放松螺旋夹板, 将乳胶管中装满 Brodie 溶液并连接在压力计上。调节螺旋夹板, 使压力计液面升至 250 毫米处。压力计液体中不应含有气泡。

3. 向与压力计配套的二个反应瓶底部分别加入 2 毫升生理盐溶液, 并向中央小杯内各加入 0.2 毫升 10% 氢氧化钾溶液<sup>①</sup>并小心地用镊子放入反复折叠的  $1.5-2$  厘米<sup>2</sup> 的滤纸 1 小张以扩大二氧化碳的吸收效率。注意切勿使碱液沾污反应瓶的其他部分。滤纸应高出中央小杯上沿 3—5 毫米。

4. 用断头法处死大白鼠, 迅速取出肝脏, 吸去血液后在冰冷条件下将组织剪成糜状。用扭力天平在纸碟上准确称取 200 毫克左右的组织糜二份, 记录每份组织糜的重量。

5. 用镊子将盛有肝糜的纸碟小心地放入反应瓶底部, 切勿使组织粘在瓶壁上。用细玻璃棒搅匀, 不要触及中央小杯中的滤纸。

6. 在第三支压力计的反应瓶中放入 2 毫升水作为温压计。

---

<sup>①</sup> 中央小杯中所置的碱溶液习惯上用氢氧化钾, 因为所生成的碳酸钾溶解度大。



7. 在各压力计连接反应瓶的磨口处和反应瓶的侧管塞上涂抹羊毛脂, 将反应瓶加在压力计上并用橡皮筋或弹簧固定。轻轻转动反应瓶, 使磨口处不漏气。转动三通活塞使闭臂与空气相通。塞好侧管上的塞子。

8. 将压力计分别装在水槽两侧的架子上, 使反应瓶及其与压力计的连接处均浸在水里。待压力计温热后, 取出压力计, 再重新转动压力计与反应瓶接口处和反应瓶侧臂上的活塞<sup>①</sup>, 当确保此二处都不漏气后, 再将压力计放入水槽中。开动马达, 使压力计以 120 次/分(振幅 2—3 厘米)的速度往复摆动。约 15 分钟后, 各瓶内外温度达到平衡。停止摆动, 将各压力计闭臂液面调整到 250 毫米处, 关闭三通活塞, 迅速记录各压力计开臂读数。

9. 重新摇动压力计, 每隔 10—20 分钟, 停止摇动, 迅速将各压力计的闭臂液面升至 250 毫升处, 记录其开臂读数。共记录一小时。

10. 实验完毕后, 先将各压力计上的三通活塞打开使反应瓶与外界相通, 然后将压力计取出恒温水槽, 取下反应瓶及其侧臂的玻璃塞, 用汽油擦净羊毛脂, 再用温热的洗涤剂或铬酸洗液浸泡后洗净。

11. 氧的吸收可参照以下的例子记录和计算。 $K$ 为在本实验条件下的反应瓶常数。从反应瓶体积计算反应瓶常数的方法参见第七章。 $\alpha_{O_2}(37^\circ C) = 0.0239$ 。

同时测定的各平行结果之间的偏差, 一般不应超过 5%。

以上实验结果也可以用符号  $Q_{O_2}$ (湿重)表示, 即相当于单位重量组织每小时所消耗氧气的微升数, 反应瓶中所用的是空气。如欲以干重表示, 符号可简写为  $Q_{O_2}$ , 此时应将几份已称重的肝组织

---

<sup>①</sup> 羊毛脂在室温下不易融化, 但在温水槽密封较好, 如用凡士林代替羊毛脂时可省略这一步。

温度: 37°C      材料: 肝糜

时 间	温 压 计		第一号瓶 $K_{O_2}=2.55$			第二号瓶 $K_{O_2}=2.05$		
	压力计 读数	$\Delta h$	压力计 读数	$\Delta h$	真正 $\Delta h$	压力计 读数	$\Delta h$	真正 $\Delta h$
12:05	250		250			251		
12:25	251	+1	220	30	$30+1=31$	219	32	$32+1=33$
12:45	252	+1	195	25	$25+1=26$	193	26	$26+1=27$
13:05	249	-3	173	22	$22-3=19$	169	24	$24-3=21$
真正 $\Delta h$ 的总和 = $h$ (毫米)			76			81		
$K \times h$ (微米)			194			203		
肝糜重(毫克)			150			152		
耗氧量(微升/ 100毫克肝/ 小时)			$194 \times \frac{100}{150} = 129$			$203 \times \frac{100}{152} = 134$		

糜分别装入已知重量的称量瓶中, 在 100°C 干燥箱中烘至恒重, 并据以计算出肝组织糜的含水量, 再加以换算。

如反应瓶中所用的是氧气, 则符号改为  $Q_{O_2}^0$ 。

## 实验三十七 用碳酸钙分离菠菜的色素

### 一、目的:

学习吸附层析法的原理。

### 二、原理:

吸附层析法的原理可以简单地用碳酸钙分离植物色素来证明。用有机溶剂提取菠菜叶, 将一支粉笔竖立在含有机提取液的烧杯中, 由于毛细管作用, 液体沿粉笔上升并表现为清楚的色带: 叶绿素为绿色, 叶黄素为黄色, 胡萝卜素为桔黄色。

### 三、器材:

1. 白色粉笔。
2. 乳钵及研杆。
3. 50 毫升烧杯。
4. 剪刀。
5. 漏斗。

#### 四、试剂和材料:

1. 新鲜菠菜。
2. 丙酮。

#### 五、操作方法:

称取新鲜菠菜叶 10 克,用剪刀剪成小块,放在乳钵中。加入丙酮 10 毫升研磨成浆状。将提取液离心或过滤除去渣子。在烧杯中放入 5 毫升提取液并在烧杯的中心垂直竖立一支白粉笔,等待一段时间后,菠菜色素就在粉笔上分离。可从带的颜色鉴定是何种色素。

## 实验三十八 吸附层析法分离叶子色素

### 一、目的:

学习用吸附层析法分离叶子色素的基本原理和操作技术。

### 二、原理:

吸附层析法是利用吸附剂表面对溶液中的不同物质所具有的不同程度的吸附作用进行分离。

用适当的溶剂如石油醚、甲醇、丙酮、苯……等,可将绿叶中的色素(叶绿素 a、叶绿素 b、胡萝卜素、叶黄素)提取出来,提取液通过吸附柱能将其中的各种色素分开。吸附柱常用蔗糖、碳酸钙、氧化铝等吸附剂作成。

### 三、器材:

1. 抽滤瓶。
2. 乳钵, 研杵。
3. 带托的玻璃棒。
4. 层析柱(或玻璃管)20 厘米×1 厘米。

#### 四、试剂和材料:

1. 40°C 烘干的菠菜叶
2. 石油醚
3. 甲醇
4. 苯
5. 无水硫酸钠
6. 细粉状蔗糖
7. 无水碳酸钙
8. 氧化铝
9. 海砂

#### 五、操作方法:

1. 取烘干的菠菜叶 1 克置于乳钵中, 加少许海砂研碎。
2. 浸入含有 22.5 毫升石油醚、2.5 毫升苯和 7.5 毫升甲醇的混合溶剂中, 放置约 1 小时。

3. 过滤。将滤液置于分液漏斗中, 加 5 毫升水轻轻上下颠倒数次, 然后弃去水层(其中溶有甲醇)。应避免激烈振荡, 否则易形成乳浊液。

4. 将剩余的液体通过装有无水硫酸钠 5 克的漏斗过滤以除去水分, 即得到色素提取液(必要时可在通风橱中小心地浓缩成数毫升)。

5. 取层析柱一支(若用玻璃管, 可在下端塞上一块棉花), 将细粉状氧化铝装入柱中, 每装入少许, 就用带托的玻璃棒压紧, 装到 3 厘米高为止。约用氧化铝 2 克。



用同样的方法再装入细粉状碳酸钙，高度为5厘米，约用2.5克。

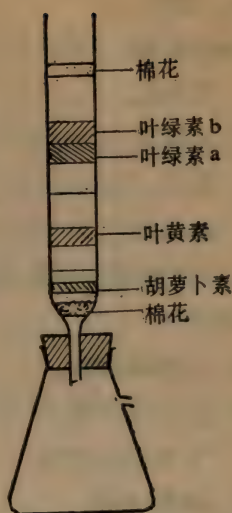
然后用同样方法装入7厘米高的细蔗糖粉末，约用3.5克。最后在蔗糖上面再放一块棉花。

6. 将做好的吸附柱装在抽滤瓶上。

7. 将石油醚和苯的混合液(4:1)倒在管的上部，使其通过吸附柱，缓慢抽滤。

8. 不等混合液渗干(在吸附柱上还保留一些混合液)，将色素提取液倒在层析管上端。

9. 使溶液通过吸附柱。并继续加入石油醚和苯的混合液(4:1)洗脱，至能区分开柱上清晰的色带为止。



## 实验三十九 用 $^{32}\text{P}$ 测定小麦幼苗根部的吸收功能

### 一、目的:

初步学习一些使用放射性同位素的基本知识和方法。

### 二、原理:

$^{32}\text{P}$  是磷的不稳定性同位素，它在核衰变过程中，放出高能  $\beta$ -粒子，通过测量计数装置便能较好地进行测量。若将用  $^{32}\text{P}$  标记的化合物，如  $\text{KH}_2^{32}\text{PO}_4$  施于植物根部，很快就会被吸收并转运到植物各部，选取植物的不同部位作样品，测定其放射性强度，便可

知道根的吸收性能,物质分配的方向,部位,数量等。

### 三、器材:

1. 培养皿。

2. 培养箱。

3. 注射器。

4. 剪刀。

5. 镊子。

6. 放射性测量计数装置(如 FH-408 自动定标器和 FJ367 通用闪烁探头)。

### 四、试剂和材料:

1. 小麦(或大麦)种子

2.  $^{32}\text{P}$  标记化合物

### 五、操作方法:

1. 选取发芽率高,大小比较一致,不霉无虫的小麦或大麦种子 50—60 粒。在室温下水浸 15—24 小时。

2. 在一个直径 9 厘米的培养皿里铺一层湿滤纸,然后选取 30 粒吸胀的种子均匀摆在滤纸上,并滴加适量水。加上皿盖。在  $15^{\circ}$ — $20^{\circ}\text{C}$  下培养。待幼芽伸长到 1 厘米时,拿掉皿盖,在有光处经 5—7 天即可长成 10 厘米高的幼苗。(注意每天加水、保持水分)。

3. 用注射器抽取含 15—20 微居里的  $^{32}\text{P}$  标记化合物<sup>①</sup>。小心地注入到两个培养皿中。不可污染叶片。晃动培养皿使  $^{32}\text{P}$  溶液均匀分布。

4. 继续在光照下培养,在半小时、1 小时和 2 小时后分别剪取

---

① 使用放射性同位素,必须严格注意防护。要穿上工作服,带好橡皮手套。被污染的用具、需经冲洗或隔离放置,直至用放射性测试仪测量无污染时才可再用。有污染的纸片样品等废物、要集中在一起,到指定地点统一深埋在土中,严禁乱扔。

叶片,测定叶片的放射性强度,观察不同时间有无变化。

#### 5. 取样与测量:

(1) 用镊子和剪子从最长的一个叶片剪取 3—4 小片,在扭力天平上称其重量(50 毫克左右)。

(2) 先测好测量碟的本底,然后将称好的叶片剪成小段(长度不要超过碟的直径)并均匀放在碟内,测量放射性。

(3) 记下脉冲数。减去本底,算出每毫克样品的放射性强度,脉冲愈多表示吸收愈强,脉冲出现愈早,说明吸收转运速度愈快。

$$\frac{\text{脉冲数} - \text{本底}}{\text{样品重量(毫克)}} = \text{脉冲/毫克}$$

(4) 试比较不同时间或不同培养条件下根部的吸收和叶片的放射性分布情况。

## 实验四十 小白鼠氨中毒

### 一、目的:

观察氨对动物体的毒害

### 二、原理:

各种原因导致的血氨升高能引起脑功能紊乱,主要产生能量代谢障碍,出现中毒征象。氨对脑细胞代谢的干扰是多方面的,如大量的氨和  $\alpha$ -酮戊二酸结合成谷氨酸,可使三羧酸循环中  $\alpha$ -酮戊二酸耗竭,从而使三羧酸循环运转发生障碍,ATP 生成减少;氨和谷氨酸合成谷氨酰胺,增加 ATP 的消耗等。

本实验给小白鼠腹腔注射氯化铵,观察氨中毒及其导致的死亡现象。

### 三、试剂和材料:

1. 小白鼠一只(约重 20 克)

## 2. 10%氯化铵溶液

### 四、器材:

1 毫升注射器

### 五、操作:

取小白鼠一只,腹腔注射 10%氯化铵 0.6 毫升左右,二三分钟后可观察到小白鼠抽搐现象,随即发生小鼠四肢及尾巴强直,不久死亡。



## 附 录

### 一、实验室规则:

1. 实验前认真预习实验内容。
2. 实验时自觉遵守课堂纪律,严格按操作规程操作,既要独立操作又要与其他同学配合。
3. 实验数据和现象应随时记录在实验本上。(不要记在纸片上!)实验结束后,实验记录必须送辅导教师审阅后才能写实验报告或离开实验室,实验报告最迟于下次实验课时交给辅导教师。
4. 精心爱护各种仪器。实验所需的一般仪器按规定借领,归还。完成实验后应将仪器洗净倒置在实验柜中并排列整齐。如有损坏或遗失需要说明原因,经辅导老师签名后方可补领,并按规定赔偿。
5. 精密贵重仪器每次使用后应登记姓名并记录仪器使用情况。要随时保持仪器的清洁。如发生故障,应立即停止使用并报告辅导教师。
6. 按需要量取用药品及蒸馏水等各种物品,要注意节约。
7. 公用仪器、药品用后放回原处。不要用个人的吸管量取公用药品,多余的药品不得倾入原试剂瓶内。特别注意公用试剂瓶的瓶塞要随开随盖,不要搞错。
8. 保存在冰箱或冷室中的任何物品都应加盖并注明保存者的姓名、班级、日期和内容物。
9. 保持台面、地面、水槽及室内整洁。含强酸强碱的废液应

倒入废液缸中。将书包及实验不需衣物放在规定的架上。

10. 不得将含有易燃溶剂的实验接近火焰。漏电的设备一律不得使用。注意安全。离开实验室前应检查水、电、门、窗。严禁用口吸取(或用皮肤接触)有毒药品和试剂。凡发生烟雾、有毒气体和不良气味的实验均应在通风橱内进行。通风橱门应紧闭,非必要时勿开。

11. 由学生轮流值日,值日生要负责当天实验室的卫生,安全和服务性的工作。

## 二、实验室基本操作

### (一) 玻璃仪器的洗涤

将新购买的玻璃仪器用自来水冲洗其表面的泥污,然后浸泡在1—2% 盐酸溶液中过夜。待用自来水冲净后再进一步洗涤。

使用过的玻璃仪器先用自来水冲洗,然后将所有待洗的玻璃仪器放在含有洗衣粉的温水中细心刷洗。待用自来水充分冲洗后用少量蒸馏水刷洗数次。凡洗净的玻璃仪器其内外壁上都不应带有水珠,否则表示未洗干净。仪器上的洗衣粉必须冲净,因为洗衣粉可能干扰某些实验。

比较脏的器皿或不便刷洗的仪器(如吸管)先用软纸擦去可能存在的凡士林或其他油污,用有机溶剂(如苯、煤油等)擦净,再用自来水冲洗后控干,放入铬酸洗液中浸泡过夜。取出后用自来水反复冲洗直至除去痕量的洗液。最后用蒸馏水涮洗数次。

普通玻璃仪器可在烘箱内烘干,但定量的玻璃仪器不能加热,一般采取控干或依次用少量酒精、乙醚涮洗后用温热的气流吹干。

铬酸洗液的配制方法有多种,现介绍常用的一种方法:小心加

热 100 毫升工业用浓硫酸，同时缓慢加入 5 克工业用重铬酸钾粉末。边加边搅拌，待全部重铬酸钾溶解后，冷却备用。洗液应贮入带塞的玻璃器皿中，玻璃器皿底部最好垫有玻璃纤维以减少仪器破损。此洗液可反复使用多次，如洗液变为绿色或过于稀释则失效。

病毒、传染病患者的血清等沾污过的容器，应先进行消毒后再进行清洗。盛过各种毒品，特别是剧毒药品和放射性同位素物质的容器必须经过专门处理，确知没有残余毒物存在时方可进行清洗。

## (二) 搅拌和振荡

配制溶液时，必须充分搅拌或振荡混匀。常用的溶液混匀方法有以下三种：

1. 搅拌式：适用于烧杯内溶液的混匀。

(1) 搅拌使用的玻璃棒必须两头都烧圆滑。

(2) 搅棒的粗细长短，必须与容器的大小和所配制的溶液的多少呈适当比例关系。

(3) 搅拌时，尽量使搅棒沿着器壁运动，不搅入空气，不使溶液飞溅。

(4) 倾入液体时，必须沿器壁慢慢倾入，以免有大量空气混入。倾倒表面张力低的液体（如蛋白质溶液）时，更需缓慢仔细。

(5) 研磨配制胶体溶液时，要使杵棒沿着研钵的一个方向进行，不要来回研磨。

2. 旋转式：适用于锥形瓶、大试管内溶液的混匀。振荡溶液时，手握住容器后以手腕、肘或肩作轴旋转容器，不应上下振荡。

3. 弹打式：适用于离心管、小试管内溶液的混匀。可由一手持管的上端用另一手的手指弹动离心管。也可以用同一手的大拇



指和食指持管的上端，用其余三个手指弹动离心管。手指持管的松紧要随着振动的幅度变化。还可以把双手掌心相对合拢，夹住离心管来回挫动。

在容量瓶中混合液体时，应倒持容量瓶摇动，用食指或手心顶住瓶塞，并不时翻转容量瓶。

在分液漏斗中振荡液体时，应用一手在适当斜度下倒持漏斗，用食指或手心顶住瓶塞，并用另一手控制漏斗的活塞。一边振荡，一边开动活塞，使气体可以随时由漏斗泄出。

### 三、常用仪器的使用

#### (一) 容量玻璃仪器的使用方法

容量仪器有装量和卸量两种。量瓶和单刻度吸管为装量仪器。滴定管、一般吸管和量筒等均为卸量仪器。

##### 1. 吸管:

吸管是生物化学实验中最常用的卸量容器。移取溶液时，如吸管不干燥，应预先用所吸取的溶液将吸管润洗 2—3 次，以确保所吸取的操作溶液浓度不变。吸取溶液时，一般用右手的大拇指和中指拿住管颈刻度线上方，把管尖插入溶液中；左手拿洗耳球，先把球内空气压出，然后把吸耳球的尖端接在吸管口，慢慢松开左手指，使溶液吸入管内。当液面升高至刻度以上时，移开吸耳球，立即用右手的食指按住管口，大拇指和中指拿住吸管刻度线上方再使吸管离开液面，此时管的末端仍靠在盛溶液器皿的内壁上。略为放松食指，使液面平稳下降，直到溶液的弯月面与刻度标线相切时，立即用食指压紧管口，取出吸管，插入接受器中，管尖仍靠在接受器内壁，此时吸管应垂直，接受器约呈  $15^\circ$  夹角。松开食指让管内溶液自然地沿器壁流下。遗留在吸管尖端的溶液及停留的时间



要根据吸管的种类进行不同处理。

(1) 无分度吸管(单刻度吸管, 移液管)见图 1。

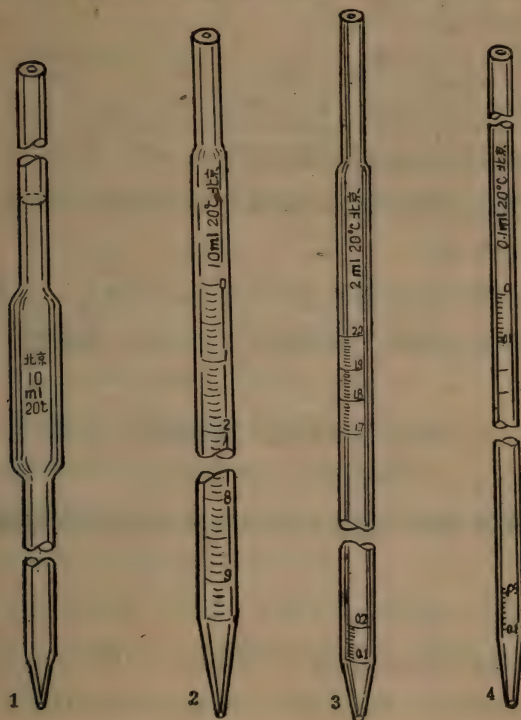
使用普通无分度吸管卸量时, 管尖所遗留的少量溶液不要吹出, 停留等待 3 秒钟, 同时转动吸管。

(2) 分度吸管(多刻度吸管、直管吸管)

分度吸管有完全流出式、吹出式和不完全流出式等多种型式。

① 完全流出式(图中 2 和 3)

上有零刻度, 下无总量刻度的, 或上有总量刻度, 下无零刻度的为完全流出式。这种吸管又分为慢流速、快流速两种。按其容量和精密度不同, 慢流速吸管又分为 A 级与 B 级, 快流速吸管只



有 B 级。使用时 A 级最后停留 15 秒, B 级停留 3 秒, 同时转动吸管, 尖端遗留液体不要吹出。

## ② 吹出式:

标有“吹”字的为吹出式, 使用时最后应吹出管尖内遗留的液体。

## ③ 不完全流出式(图中 4)。

有零刻度也有总量刻度的为不完全流出式。使用时全速流出至相应的容量标刻线处。

为便于准确快速地选取所需的吸管, 国际标准化组织统一规定: 在分度吸管的上方印上各种彩色环, 其容积标志如下表:

标称容量 (ml)	0.1	0.2	0.25	0.5	1	2	5	10	25	50
色标	红	黑	白	红	黄	黑	红	桔红	白	黑
标注方式	单	单	双	双	单	单	单	单	单	单

不完全流出式在单环或双环上方再加印一条宽 1—1.5mm 的同颜色彩环以与完全流出式分度吸管相区别。

## 使用注意事项:

(1) 应根据不同的需要选用大小合适的吸管, 如欲量取 1.5 毫升的溶液, 显然选用 2 毫升吸管要比选用 1 毫升或 5 毫升吸管误差小。

(2) 吸取溶液时要把吸管插入溶液深处, 避免吸入空气而将溶液从上端溢出。

(3) 吸管从液体中移出后必须用滤纸将管的外壁擦干, 再行放液。

## 2. 滴定管:

可以准确量取不固定量的溶液或用于容量分析。常用的常量滴定管有 25 毫升及 50 毫升两种, 其最小刻度单位是 0.1 毫升, 滴

定后读数时可以估计到小数点后两位数字。在生物化学工作中常使用 2 及 5 毫升半微量滴定管。这种滴定管内径狭窄，尖端流出的液滴也小，最小刻度单位是 0.01 毫升至 0.02 毫升，读数可到小数点后第三位数字。在读数以前要多等候一段时间，以便让溶液缓慢流下。

### 3. 量筒:

量筒不是吸管或滴定管的代用品。在准确度要求不高的情况下，用来量取相对大量的液体。不需加热促进溶解的定性试剂可直接在具有玻璃塞的量筒中配制。

### 4. 容量瓶:

容量瓶具有狭窄的颈部和环形的刻度。是在一定温度下(通常为 20°C)检定的，含有准确体积的容器。使用前应检查容量瓶的瓶塞是否漏水，合格的瓶塞应系在瓶颈上，不得任意更换。容量瓶刻度以上的内壁挂有水珠会影响准确度，所以应该洗得很干净。所称量的任何固体物质必须先在小烧杯中溶解或加热溶解，冷却至室温后才能转移到容量瓶中。容量瓶绝不应加热或烘干。

## (二) 台秤

台秤又叫药物天平是用于粗略称量的仪器。常用的有 100 克(感量 0.1 克)、200 克(感量 0.2 克)、500 克(感量 0.5 克)和 1000 克(感量 1 克)四种。其使用方法如下:

1. 根据所称物品的重量选择合适的台秤。

2. 将游码移至标尺“0”处，调节横梁上的螺丝使指针停止在刻度中央或使其左右摆动的格数相等。

3. 将称量用纸或玻璃器皿(易吸潮的药品称重时应放在带盖的器皿中)放在左盘上，砝码放在右盘上。使指针重新平衡摆动，则右盘上的砝码总量(包括游码代表的重量)即代表左盘上称量用

纸(或器皿)的重量,记录此重量。

4. 向纸或器皿中加入称重的物品再向左盘上加砝码使重新达到平衡,将所得砝码总重减去纸或容器的重量即得所称物品的重量。

5. 必须用镊子夹取砝码,加砝码的顺序是从大到小。

6. 称量完毕,将游码重新移至“0”处,清洁称重盘,放回砝码。

### (三) 光学天平

1. 光学天平的使用方法:

1. 被称物要称准到1毫克时才准使用分析天平。被称物重量不得超过天平最大载荷。若被称物较重,应先在粗天平上试称。

(2) 在同一次实验中应使用同一台天平相同一盒砝码。不同砝码组内之砝码不能随意调换。

(3) 每次称量前检查天平位置是否水平,零点偏差多少。零点偏差超过1毫克时,需调整后再用。

(4) 天平机构有任何损坏或其使用不正常时,在未消除故障以前应停止使用。

(5) 使用过程中要特别注意保护玛瑙刀口,起落升降横梁时应缓慢,不得使天平剧烈振动。

(6) 取放被称物或加减砝码都必须把天平横梁托起(关闭天平)以免损坏刀口。

(7) 被称物的温度必须和天平室的室温一致。

(8) 被称物须盛在干净的容器中称量。具有腐蚀性的蒸气或吸湿性的物质必须放在密闭的容器内称量。

(9) 被称物和砝码要放在天平盘的中央。



(10) 天平的前门不得随意打开。称量过程中只能打开左右两个边门。取放物品或加减砝码时开关门要轻而慢。称量时天平的各玻璃门要紧闭。

(11) 必须用镊子夹取砝码, 严禁用手拿取。按从大到小顺序缓慢增加砝码。加环码时要注意以免环码跳落或变位, 影响称量数据。

(12) 使用完毕后必须将天平横梁托住(将开关手柄关闭, 最好取下)。然后将砝码放回原位(包括盒砝码和环砝码)。清洁天平, 断开电源, 再用罩把天平罩好, 并登记使用情况后方可离开天平室。

2. 天平的调整: 较大的调整应由保管天平的专人或教师进行。

(1) 调水平: 用天平前位两个底脚螺丝调正水准器。气泡在水准器正中央即为水平。

(2) 调零点: 即使微量标尺上的 0 点与游标(光屏)刻线完全重合。

① 较大的零点调整。可移动横梁上左右平衡螺丝的位置。

② 较小的零点调整。即微量标尺“0”点与游标(光屏)刻线相距 3 格以内, 可转动底板下面的拨杆。

(3) 调光学系统:

① 射影颜色: 若灯光射影显示骚扰的颜色, 明暗不一, 可转动和移动聚光镜的位置。

② 射影不正: 如光学投影上的刻度偏上或偏下, 可移动一次反射镜的角度来调整。

③ 射影明晰性: 如光学投影上的射影不清晰或重线, 可调放大镜的距离。

(4) 调感量: 用重心螺丝调感量。重心螺丝向上移动时感量

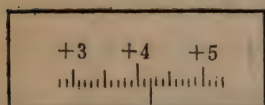
增大。重心螺丝向下移动时感量减小。没有一定经验的人，不要随意自行调整感量。

(5) 调秤盘磨擦的适度: 当天平停止使用时，秤盘应正好与下面的托盘轻微接触，如托盘太高或太低，可将托盘拨下，调整托盘螺丝的长短使其磨擦适度。

(6) 当天平开动后，光学投影在停止前应左右摆动自如。如摆动突然停止，则指针阻尼器等发生摩擦，应仔细检查各部分安装是否正正确然后纠正其不正确处，让天平自由地摆动。

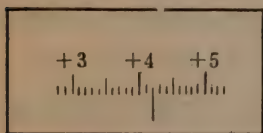
### 3. 读数方法:

(1) 在十毫克以下称量时



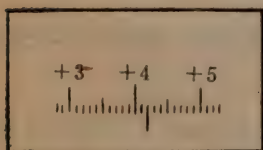
$$4.2 \text{ mg} = 0.0042 \text{ g}$$

(2) 在十毫克以上

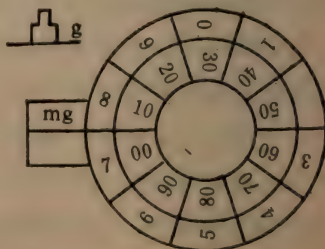
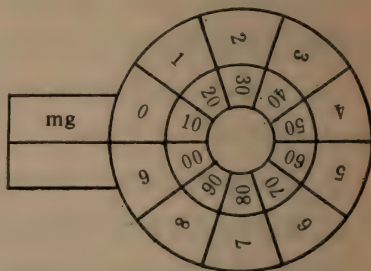


$$14.2 \text{ mg} = 0.0142 \text{ g}$$

(3) 在一克以上



$$1814.2 \text{ mg} = 1.8142 \text{ g}$$



4. 注意事项: 天平应固定专人管理, 定期复检、调整及维护。

(1) 天平室要保持高度清洁, 清扫天平室时, 只能用带潮气的布擦拭, 决不能用湿透的拖把拖地。潮湿物品切勿带入室内, 以免增加湿度。

(2) 应随时清洁天平外部, 至少一周清洁一次。一般可用软毛刷, 绒布或麂皮拂去天平上的灰尘, 清洁时注意不得用手直接接触天平零件, 以免水份遗留在零件上引起金属氧化和量变。因此应戴细纱手套和极薄的胶皮手套, 并顺其金属光面条纹进行, 以免零件光洁度受损。为避免有害物质的存留, 在每次衡量完毕后, 应立即清洁底座。横梁上之玛瑙刀口的工作棱边应保持高度清洁, 常使用麂皮顺其棱边前后滑动, 用慢速清洁, 中刀承和边刀垫之玛瑙平面及各部之玛瑙轴承也用麂皮清洁。阻尼器的壁上可用软毛刷和麂皮清洁后, 再用二十至三十倍放大镜观察是否仍有细小物质的存在。

(3) 天平玻璃框内需放防潮剂, 最好用变色硅胶, 并注意更换。

(4) 带有该天平和砝码实差的检定合格证书应放在该天平和砝码附近以便衡量时获得准确的必要数据。

(5) 搬动天平一定要卸下横梁、吊耳和秤盘。远距离搬动还要包装好。箱外应标志方向和易损符号, 并注明有精密仪器切勿倒置等字样。

#### (四) 分光光度计

##### 1. 72 型分光光度计

##### (1) 操作方法

① 根据说明书的要求, 用导线把微电计、稳压器和单色光器正确连接好。

② 先检查电源电压与仪器所标注的电压是否相符, 然后再插



上电源。

③ 把单色光器的光路闸门拨到黑点位置,再将微电计电源开关拨到“开”处,此时在标尺上即出现指示光点。用零点调节器把指示光点的黑线准确地调到透光率标尺的零位上。

④ 打开稳压器的电源开关和单色光器的电源开关,把光路闸门拨到红点位置上,再以顺时针方向旋光量调节器,使微电计的指示光点达到标尺上限附近。待硒光电池趋于稳定后(约 10 分钟),再使用仪器。

⑤ 打开比色皿暗厢盖,取出比色皿架。把四只比色皿中的一只装入空白溶液或蒸馏水,其余三只装入未知溶液。把装有空白溶液或蒸馏水的比色皿放在架的第一格内,其它的比色皿依次放好。把比色皿架正确地放于暗厢内的定位装置上,将暗厢盖好。

⑥ 旋转波长调节器,使所需的波长对准红线。把光路闸门拨到红点上,此时空白溶液正对在光路上。旋转光量调节器使指示光点准确地位于透光率“100”的位置。

⑦ 把光路闸门重新拨到黑点处,再一次校正微电计的指示光点于零位。立即把光路闸门拨到红点处,再一次校正微电计的指示光点对准透光率“100”的位置上。

⑧ 把比色皿定位装置的拉杆轻轻地拉出一格,此时第二个比色皿内的未知溶液进入光路,此时微电计标尺上所指的读数即为该溶液的光吸收值和透光率。其它的未知溶液也按此法进行测定。

⑨ 测定完毕,应立即把比色皿用自来水冲洗,并用蒸馏水洗净,然后倒置在滤纸上晾干备用。

⑩ 把仪器的旋钮复原,关闭开关。拔下电源,并用塑料罩盖好仪器。

## (2) 注意事项

① 仪器的连续使用时间不应超过两小时。使用后必须间歇半



小时,才能再用。

② 务必保持比色皿透光面的清洁。不要用手摸比色皿的光滑的表面,更不要用毛刷刷洗比色皿,以免影响读数的准确。

③ 脏的比色皿可浸泡在肥皂水中,然后再用自来水和蒸馏水冲洗干净。倒置晾干备用。

④ 比色皿外边沾有水或待测溶液时,可先用滤纸吸干,再用镜头纸揩净。

⑤ 把比色皿放入比色皿架时,要注意尽量使它们的位置前后一致。

⑥ 测定时应尽量使被测溶液的光吸收值在 0.1—0.65 范围内。

⑦ 仪器的周围应干燥。仪器使完后,应该用塑料套子罩住,并在套子内放数袋防潮硅胶。

⑧ 经常注意单色光器的防潮硅胶是否受潮,并及时调换或烘干。

## 2. 721 型分光光度计

### (1) 操作方法

① 在接通电源之前,应该对于仪器的安全性进行检查,电源线接线应牢固,通地要良好,各个调节旋钮的起始位置应该正确。

② 电表的指针必须位于零刻线上。若指针偏离,则可用电表上的校正螺丝进行调节。

③ 将仪器的电源接通,打开比色皿暗厢盖,使电表指针处于零位。预热 20 分钟后,才能使用。

④ 调节波长旋钮至所需用的单色光波长,选择相应的放大灵敏度档,再用零位电位器校正电表指针指在零位。

⑤ 将预先装好空白溶液和待测溶液的比色皿依次放入暗厢内的比色皿架上。此时空白溶液应位于光路上。盖上暗箱,使光

电管见光,旋转光量调节器,使光电管输出的光电信号能使电表指针正确处于 100%。

⑥ 按上述方法连续几次调整零位和使电表指针指在 100% 后,即可进行测定工作。

⑦ 在最后一次调节电表指针,使它指在透光率 100% 后,轻拉比色皿定位装置的拉杆,使待测溶液进入光路。此时由标尺上可直接读出光吸收值和透光率的读数。

## (2) 注意事项

① 放大器灵敏度档的选择是根据不同的单色光波长,光能量不一致时分别选用。各档的灵敏度范围是:第一档 $\times 1$ 倍,第二档 $\times 10$ 倍,第三档 $\times 20$ 倍。原则是能使空白档良好地用光量调节器调整于 100% 处。

② 仪器底部有二只干燥剂筒,以保持仪器的干燥,此外在仪器停止工作期间,在比色皿暗箱内,塑料仪器套内都应放防潮硅胶袋。

③ 其它见 72 型分光光度计注意事项。

## 3. 751G 型分光光度计

### (1) 操作方法

① 检查电源电压是否与仪器所要求的电压相符,然后再插上电源插头。

② 根据测定所要求的波长选择光源灯。在波长 320—1,000 nm 范围内用钨灯。在波长 200—320nm 范围内,用氢弧灯作为光源。拨动光源选择杆使所需要的光源灯进入光路。根据需要可以把滤光片推入光路,以减少杂散光,但通常情况下没有必要。把波长刻度旋到所要的波长上。

③ 检查仪器的各种开关和旋钮使处于关闭位置。然后再打开电源开关,使仪器预热 20 分钟。

④ 选择适当波长的光电管。如测定的波长在 200—625 nm 范围内,用紫敏光电管,此时应将手柄推入。如测定的波长在 625—1000nm 范围,用红敏光电管,应将手柄拉出。

⑤ 根据波长选择比色皿。测定的波长在 350nm 以上时,用玻璃比色皿。测定波长在 350nm 以下时,则需用石英比色皿。在比色皿中装好溶液,放在暗箱内的托架上,然后把暗箱盖好。

⑥ 把选择开关拨到“校正”位置上。调节暗电流使电表指针指到“0”。为了得到较高的准确度,每测量一次都应校正一次暗电流。

⑦ 在一般情况下,旋转灵敏度旋钮从左边停止位置顺时针转动三圈左右。

⑧ 旋转读数钮,使刻度盘位于透光率 100% 位置上。把选择开关拨到“ $\times 1$ ”处,然后拉开暗电流闸门,使单色光进入光电管。

⑨ 调节狭缝,使电表指针接近到零位。而后再用灵敏度旋钮细致调节,使电表指针正确地指在“0”上。

⑩ 把比色皿定位装置的拉杆轻轻地拉出一格(注意滑板是否处在定位槽中),使试样溶液进入光路,这时电表指偏离零位。

⑪ 转动读数电位器旋钮,重新使电表指针移到“0”位上,此时刻度盘上的读数即为试样的透光率和相应的光吸收值。

⑫ 取得读数后,应即时将暗电流闸门重新关上,以保护光电管,防止受光时间过长而疲劳。

⑬ 在读取透光率和相应消光值的数值时,若选择开关在“ $\times 1$ ”处,透光率范围为 0—100%,相应消光值范围由  $\infty$ —0。当透光率小于 10% 时,则可把选择开关拨到“ $\times 0.1$ ”位置,此时所读取的透光率数值,应以 10 除之。而所读出的消光值应加上 1.0。

⑭ 用同一标准溶液需要测定几个样品时,可重复以上的操作。



⑮ 测定完后,应把各个旋钮和开关复原和关闭,拔下插销,并把仪器罩好。

## (2) 注意事项

① 在电压变动较大的地方,应使用稳压器,以确保仪器稳定工作。

② 其它见 72 型分光光度计注意事项。

## (五) 电动离心机

离心机是利用离心力分离母液和沉淀的一种仪器。根据离心容量的不同可将电动离心机分为大、中、小三种类型。这三种类型离心机的最高转速通常都是 4000 转/分。生物化学实验室常使用小型或中型的电动离心机。

### 1. 使用方法

(1) 检查离心机调速旋钮是否处在零位,外套管是否完整无损和垫有橡皮垫。

(2) 离心前,先将离心的物质转移入合适的离心管中,其量以距离心管口 1—2 厘米为宜,以免在离心时甩出。将离心管放入外套管中,在外套管与离心管间注入缓冲水,使离心管不易破损。

(3) 取一对外套管(内已有离心管)放在台秤上平衡。如不平衡,可调整缓冲用水或离心物质的量。将平衡好的套管放在离心机十字转头的对称位置上。把不用的套管取出,并盖好离心机盖。

(4) 接通电源,开启开关。

(5) 平稳、缓慢地移动调速手柄(约需 1—2 分钟)至所需转速,待转速稳定后再开始计时。

(6) 离心完毕,将手柄慢慢地调回零位。关闭开关。切断电源。



(7) 待离心机自行停止转动后, 才可打开机盖, 取出离心样品。

(8) 将外套管、橡胶垫冲洗干净, 倒置干燥备用。

## 2. 注意事项:

(1) 离心机要放在平坦和结实的地面或实验台上, 不允许倾斜。

(2) 离心机应接地线, 以确保安全。

(3) 离心机启动后, 如有不正常的噪音及振动时, 可能离心管破碎或相对位置上的两管重量不平衡, 应立即关机处理。

(4) 须平稳、缓慢增减转速。关闭电源后, 要等候离心机自动停止。不允许用手或其它物件迫使离心机停转。

(5) 一年检查一次电动机的电刷及轴承磨损情况, 必要时更换电刷或轴承。注意电刷型号必须相同。更换时要清洗刷盒及整流子表面污物。新电刷要自由落入刷盒内。要求电刷与整流子外圆吻合。轴承缺油或有污物时, 应清洗加油, 轴承采用二硫化钼锂基脂润滑。加量一般为轴承空隙的 $\frac{1}{2}$ 。

## (六) 干燥箱和恒温箱

干燥箱用于物品的干燥和干热灭菌, 恒温箱用于微生物和生物材料的培养。这两种仪器的结构和使用方法相似, 干燥箱的使用温度范围为 50—250°C, 常用鼓风式电热以加速升温。恒温箱的最高工作温度为 60°C。

### 1. 使用方法

(1) 将温度计插入座内(在箱顶放气调节器中部)。

(2) 把电源插头插入电源插座。

(3) 将电热丝分组开关转到 1 或 2 位置上(视所需温度而

定), 此时可开启鼓风机促使热空气对流。电热丝分组开关开启后, 红色指示灯亮。

(4) 注意观察温度计。当温度计温度将要达到需要温度时, 调节自动控温旋钮, 使绿色指示灯正好发亮, 十分钟后再观察温度计和指示灯, 如果温度计上所指温度超过需要, 而红色指示灯仍亮, 则将自动控温旋钮略向反时针方向旋转, 直调到温度恒定在要求的温度上, 指示灯轮番显示红色和绿色为止。自动恒温器旋钮在箱体正面左上方。它的刻度板不能做为温度标准指示, 只能做为调节用的标记。

(5) 在恒温过程中, 如不需要三组电热丝同时发热时, 可仅开启一组电热丝。开启组数越多, 温度上升越快。

(6) 工作一定时间后, 可开启顶部中央的气调节器将潮气排出, 也可以开启鼓风机。

(7) 使用完毕后将电热丝分组开关全部关闭, 并将自动恒温器的旋钮沿反时针方向旋至零位。

(8) 将电源插头拔下。

## 2. 注意事项:

(1) 使用前检查电源, 要有良好地线。

(2) 干燥箱无防爆设备, 切勿将易燃物品及挥发性物品放入箱内加热。箱体附近不可放置易燃物品。

(3) 箱内应保持清洁, 放物网不得有锈, 否则影响玻璃器皿洁度。

(4) 使用时应定时监看, 以免温度升降影响使用效果或发生事故。

(5) 鼓风机的电动机轴承应每半年加油一次。

(6) 切勿拧动箱内感温器, 放物品时也要避免碰撞感温器, 否则温度不稳定。

(7) 检修时应切断电源。

## (七) 电热恒温水浴

电热恒温水浴用于恒温加热和蒸发,最高工作温度为  $100^{\circ}\text{C}$ ,此仪器利用控温器控制温度,所以工作原理和使用方法与干燥箱相似。但应注意使用前在水浴槽内加足量的水以避免电热管烧坏。如较长时间不使用,必须放尽水槽内的全部水。

## (八) 电冰箱

电冰箱是一种小型制冷设备,主要用于药品、试剂和生物材料的保存。

根据箱内容积大小,目前有 70 升、100 升、160 升和 200 升等规格的全封闭型电冰箱。制冷剂一般用二氯二氟甲烷  $\text{CF}_2\text{Cl}_2$  (简称 F-12)。

### 1. 电冰箱的使用

(1) 冰箱应放在空气流通、干燥、不受阳光直晒、不靠近热源的地方。电冰箱箱体要离墙 10 厘米以上,便于空气流通。放置要平稳。

(2) 使用电源要符合电冰箱铭牌规定,电源用线在 5 安培以上,并要装有 2 安培额定保险线。要有良好的地线,接地电阻不大于 5 欧姆。

(3) 温度控制器上数字,是调节时的记号,不是箱内的真实温度,故应在箱内放置温度计。温度控制器旋钮上的数字越大,温度就越低。旋到“停”字时,机器停车。调节温度时,箱内的温度是逐渐下降和升高的,每调整一次,必须经过多次自停、自开后温度才能稳定。如仍达不到要求,可做二次或三次调整。

(4) 托架上切勿摆满存放物品。应留有空隙,以便空气流通,



保持箱内温度均匀。

(5) 热物品应冷却到室温后再放入箱内。

(6) 冰箱上部温度低,下部温度高,放入物品时要注意根据所需温度存放。盛水溶液的玻璃瓶或怕冻物品,应距蒸发器稍远些,以免因结冰冻破瓶子。

(7) 所存放的物品必须注明物品名称、存放日期、存放人。有特殊气味的物品应严加包装,以防污染。

## 2. 冰箱的维护

(1) 使用时,开冰箱门的次数要尽量少,关门要快要严,以减少侵入箱内的热量。

(2) 冰箱内不宜放置强酸强碱和其它腐蚀性物品。

(3) 蒸发器上的冰霜太厚时(2厘米左右)会影响制冷效果,此时应化霜。将温度控制器旋至“化霜”点即可化霜,霜化完后再回复到原位。切忌用金属器撬冰或敲打,化霜时注意接霜水。

(4) 搬动电冰箱时要轻,不要倾斜,不要倒置。

(5) 应保持电冰箱的清洁,箱内外每月要用肥皂水冲洗一次。至少每半年彻底清扫一次箱体后面冷凝器上的灰尘。因灰尘太厚时隔热,会使冰箱的制冷效率降低。

(6) 要定期检查启动继电器(一般可半年检查一次)。因启动接点一天开几十次(正常时每小时开停6次)。启动接点的开停会产生火花,使得接点面烧成凹凸不平,导致启动过长或损坏冰箱。如接点有损坏,用零零号细砂纸磨光,即可保证接点启动良好。

(7) 电冰箱临时不用时,不用拔下电源插头,但应注意检查电源。电压过低时易烧坏压缩机。

## (九) 酸度计

酸度计是测量 pH 值的精密仪器,也可用来测量电动势。



## 1. 使用方法

### (1) 安装

① 电源的电压与频率必须符合仪器铭牌上所指明的数据,同时必须接地良好,否则在测量时可能指针不稳。

② 仪器配有玻璃电极和甘汞电极。将玻璃电极的胶木帽夹在电极夹的小夹子上。将甘汞电极的金属帽夹在电极夹的大夹子上。可利用电极夹上的支头螺丝调节两个电极的高度。

③ 玻璃电极在初次使用前,必须在蒸馏水中浸泡 24 小时以上。平常不用时也应浸泡在蒸馏水中。

④ 甘汞电极在初次使用前,应浸泡在饱和氯化钾溶液内,不要与玻璃电极同泡在蒸馏水中。不使用时也浸泡在饱和氯化钾溶液中或用橡胶帽套住甘汞电极的下端毛细孔。

### (2) 校整

① 将“pH-mv”开关拨到 pH 位置。

② 打开电源开关,指示灯亮,预热 30 分钟。

③ 取下放蒸馏水的小烧杯,并用滤纸轻轻吸去玻璃电极上的多余水珠。在小烧杯内放入选择好的,已知 pH 值的标准缓冲溶液。将电极浸入。注意应使玻璃电极端部小球和甘汞电极的毛细孔浸在溶液中。轻轻摇动小烧杯使电极所接触的溶液均匀。

④ 根据标准缓冲液的 pH 值,将量程开关拧到 0—7 或 7—14 处。

⑤ 调节控温钮,使旋钮指示的温度与室温同。

⑥ 调节零点,使指针指在 pH 7 处。

⑦ 轻轻按下或稍许转动读数开关使开关卡住。调节定位旋钮,使指针恰好指在标准缓冲液的 pH 数值处。放开读数开关,重复操作,直至数值稳定为止。

⑧ 校整后,切勿再旋动定位旋钮,否则需重新校整。取下标

准液小烧杯,用蒸馏水冲洗电极。

### (3) 测量:

① 将电极上多余的水珠吸干或用被测溶液冲洗二次,然后将电极浸入被测溶液中,并轻轻转动或摇动小烧杯,使溶液均匀接触电极。

② 被测溶液的温度应与标准缓冲溶液的温度相同。

③ 校整零位,按下读数开关,指针所指的数值即是待测液的pH值。若在量程pH 0—7范围内测量时指针读数超过刻度,则应将量程开关置于pH 7—14处再测量。

④ 测量完毕,放开读数开关后,指针必须指在pH 7处,否则重新调整。

⑤ 关闭电源,冲洗电极,并按照前述方法浸泡。

### 2. 注意事项:

(1) 防止仪器与潮湿气体接触。潮气的浸入会降低仪器的绝缘性,使其灵敏度、精确度、稳定性都降低。

(2) 玻璃电极小球的玻璃膜极薄,容易破损。切忌与硬物接触。

(3) 玻璃电极的玻璃膜不要沾上油污,如不慎沾有油污可先用四氯化碳或乙醚冲洗,再用酒精冲洗,最后用蒸馏水洗净。

(4) 甘汞电极的氯化钾溶液中不允许有气泡存在,其中有极少结晶,以保持饱和状态。如结晶过多,毛细孔堵塞,最好从新灌入新的饱和氯化钾溶液。

(5) 如酸度计指针抖动严重,应更换玻璃电极。

### 3. 标准缓冲液的配制:

酸度计所用的标准缓冲液的试剂容易提纯也比较稳定。常用的配制方法如下:

(1) pH=4.00 的标准缓冲液

称取在 105°C 干燥一小时的磷苯二甲酸氢钾 5.07 克, 加重蒸馏水溶解, 并定容至 500 毫升。

## (2) pH=6.88 的标准缓冲液

称取在 130°C 干燥二小时的磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 3.401 克, 磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 8.95 克或无水磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 3.549 克, 加重蒸馏水溶解并定容至 500 毫升。

## (3) pH=9.18 的标准缓冲液

称取硼酸钠 ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) 3.8144 克或无水硼酸钠 ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ) 2.02 克, 加重蒸馏水溶解并定容至 100 毫升。

# 四、常用缓冲溶液的配制

生物实验室中常用的某些缓冲液列在下表中。绝大多数缓冲液的有效范围约在其  $\text{pK}_a$  值左右 1 pH 单位。

酸 或 碱	$\text{pK}_{a_1}$	$\text{pK}_{a_2}$	$\text{pK}_{a_3}$
磷酸	2.1	7.2	12.3
柠檬酸	3.1	4.8	5.4
碳酸	6.4	10.3	—
醋酸	4.8	—	—
巴比妥酸	3.4	—	—
Tris(三羟甲基氨基甲烷)	8.3	—	—

选择实验的缓冲系统时, 要特别慎重。因为影响实验结果的因素有时并不是缓冲液的 pH, 而是缓冲液中的某种离子。选用下列缓冲系统时应加以注意。

1. 硼酸盐 这个化合物能与许多化合物(如糖)生成复合物。
2. 柠檬酸盐 柠檬酸离子能与钙离子结合, 因此不能在  $\text{Ca}^{2+}$  存在时使用。



3. 磷酸盐 它可能在一些实验中作为酶的抑制剂甚至代谢物起作用。重金属离子能与此溶液生成磷酸盐沉淀, 而且它在 pH7.5 以上的缓冲能力很小。

4. Tris 这个缓冲液能在重金属离子存在时使用, 但也可能在某些系统中起抑制剂的作用。它的主要缺点是温度效应(此点常被忽视)。室温时 pH 7.8 的 Tris 缓冲液在 4°C 时的 pH 为 8.4, 在 37°C 时为 7.4, 因此一种物质在 4°C 制备时到 37°C 测量时其氢离子浓度可增加 10 倍之多。Tris 在 pH 7.5 以下的缓冲能力很弱。

### (一) 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液

pH	0.2摩尔/升 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (毫升)	0.1摩尔/升 柠檬酸 (毫升)	pH	0.2摩尔/升 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (毫升)	0.1摩尔/升 柠檬酸 (毫升)
2.2	0.40	19.60	5.2	10.72	9.28
2.4	1.24	18.76	5.4	11.15	8.85
2.6	2.18	17.82	5.6	11.60	8.40
2.8	3.17	16.83	5.8	12.09	7.91
3.0	4.11	15.89	6.0	12.63	7.37
3.2	4.94	15.06	6.2	13.22	6.78
3.4	5.70	14.30	6.4	13.85	6.15
3.6	6.44	13.56	6.6	14.55	5.45
3.8	7.10	12.90	6.8	15.45	4.55
4.0	7.71	12.29	7.0	16.47	3.53
4.2	8.28	11.72	7.2	17.39	2.61
4.4	8.82	11.18	7.4	18.17	1.83
4.6	9.35	10.65	7.6	18.73	1.27
4.8	9.86	10.14	7.8	19.15	0.85
5.0	10.30	9.70	8.0	19.45	0.55

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 分子量=141.98; 0.2 摩尔/升溶液为 28.40 克/升。

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 分子量=178.05; 0.2 摩尔/升溶液含 35.61 克/升;

C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O 分子量=210.14; 0.1 摩尔/升溶液为 21.01 克/升。



## (二) 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(0.1摩尔/升)

pH	0.1摩尔/升 柠檬酸 (毫升)	0.1摩尔/升 柠檬酸钠 (毫升)	pH	0.1摩尔/升 柠檬酸 (毫升)	0.1摩尔/升 柠檬酸钠 (毫升)
3.0	18.6	1.4	5.0	8.2	11.8
3.2	17.2	2.8	5.2	7.3	12.7
3.4	16.0	4.0	5.4	6.4	13.6
3.6	14.9	5.1	5.6	5.5	14.5
3.8	14.0	6.0	5.8	4.7	15.3
4.0	13.1	6.9	6.0	3.8	16.2
4.2	12.3	7.7	6.2	2.8	17.2
4.4	11.4	8.6	6.4	2.0	18.0
4.6	10.3	9.7	6.6	1.4	18.6
4.8	9.2	10.8			

柠檬酸  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ , 分子量 210.14; 0.1 摩尔/升溶液为 21.01 克/升。

柠檬酸钠  $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ , 分子量 = 294.12; 0.1 摩尔/升溶液为 29.41 克/升。

## (三) 醋酸-醋酸钠缓冲液(0.2摩尔/升)

pH(18°C)	0.2摩尔/升 NaAC(毫升)	0.2摩尔/升 HAC(毫升)	pH(18°C)	0.2摩尔/升 NaAC(毫升)	0.2摩尔/升 HAC(毫升)
3.6	0.75	9.25	4.8	5.90	4.10
3.8	1.20	8.80	5.0	7.00	3.00
4.0	1.80	8.20	5.2	7.90	2.10
4.2	2.65	7.35	5.4	8.60	1.40
4.4	3.70	6.30	5.6	9.10	0.90
4.6	4.90	5.10	5.8	9.40	0.60

$NaAC \cdot 3H_2O$  分子量 = 136.09; 0.2 摩尔/升溶液为 27.22 克/升。

## (四) 磷酸盐缓冲液

### 1. 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液(0.2 摩尔/升)

pH	0.2摩尔/升 $Na_2HPO_4$ (毫升)	0.2摩尔/升 $NaH_2PO_4$ (毫升)	pH	0.2摩尔/升 $Na_2HPO_4$ (毫升)	0.2摩尔/升 $NaH_2PO_4$ (毫升)
5.8	8.0	92.0	7.0	61.0	39.0
5.9	10.0	90.0	7.1	67.0	33.0
6.0	12.3	87.7	7.2	72.0	28.0

续 表

pH	0.2摩尔/升 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (毫升)	0.2摩尔/升 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (毫升)	pH	0.2摩尔/升 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (毫升)	0.2摩尔/升 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (毫升)
6.1	15.0	85.0	7.3	77.0	23.0
6.2	18.5	81.5	7.4	81.0	19.0
6.3	22.5	77.5	7.5	84.0	16.0
6.4	26.5	73.5	7.6	87.0	13.0
6.5	31.5	68.5	7.7	89.5	10.5
6.6	37.5	62.5	7.8	91.5	8.5
6.7	43.5	56.5	7.9	93.0	7.0
6.8	49.0	51.0	8.0	94.7	5.3
6.9	55.0	45.0			

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  分子量=178.05; 0.2 摩尔/升溶液为 35.61 克/升

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  分子量=358.22; 0.2 摩尔/升溶液为 71.64 克/升

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  分子量=138.01; 0.2 摩尔/升溶液为 27.6 克/升

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  分子量=156.03; 0.2 摩尔/升溶液为 31.21 克/升

## 2. 磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液(1/15摩尔/升)

pH	1/15摩尔/升 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (毫升)	1/15摩尔/升 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (毫升)	pH	1/15摩尔/升 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (毫升)	1/15摩尔/升 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (毫升)
4.92	0.10	9.90	7.17	7.00	3.00
5.29	0.50	9.50	7.38	8.00	2.00
5.91	1.00	9.00	7.73	9.00	1.00
6.24	2.00	8.00	8.04	9.50	0.50
6.47	3.00	7.00	8.34	9.75	0.25
6.64	4.00	6.00	8.67	9.90	0.10
6.81	5.00	5.00	8.18	10.00	0
6.98	6.00	4.00			

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  分子量=178.05; 1/15 摩尔/升溶液为 11.876 克/升。

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  分子量=136.09; 1/15 摩尔/升溶液为 9.078 克/升。

### (五) 巴比妥钠-盐酸缓冲液(18°C)

pH	0.04摩尔/升 巴比妥钠溶液 (毫升)	0.2摩尔/升 盐酸(毫升)	pH	0.04摩尔/升 巴比妥钠溶液 (毫升)	0.2摩尔/升 盐酸(毫升)
6.8	100	18.4	8.4	100	5.21
7.0	100	17.8	8.6	100	3.82
7.2	100	16.7	8.8	100	2.52
7.4	100	15.3	9.0	100	1.65
7.6	100	13.4	9.2	100	1.13
7.8	100	11.47	9.4	100	0.70
8.0	100	9.39	9.6	100	0.35
8.2	100	7.21			

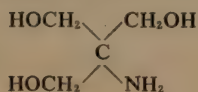
巴比妥盐分子量=206.18; 0.04 摩尔/升溶液为 8.25 克/升

### (六) Tris-盐酸缓冲液(25°C)

50 毫升 0.1 摩尔/升三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 溶液与 X 毫升 0.1 摩尔/升盐酸混匀后, 加水稀释至 100 毫升。

pH	X(毫升)	pH	X(毫升)
7.10	45.7	8.10	26.2
7.20	44.7	8.20	22.9
7.30	43.4	8.30	19.9
7.40	42.0	8.40	17.2
7.50	40.3	8.50	14.7
7.60	38.5	8.60	12.4
7.70	36.6	8.70	10.3
7.80	34.5	8.80	8.5
7.90	32.0	8.90	7.0
8.00	29.2		

三羟甲基氨基甲烷(Tris)



分子量=121.14;

0.1 摩尔/升溶液为 12.114 克/升。Tris 溶液可从空气中吸收二氧化碳, 使用时注意将瓶盖严。

# (七) 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液(0.1摩尔/升) ,

$\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  存在时不得使用

pH		0.1摩尔/升	0.1摩尔/升
20°C	37°C	$\text{Na}_2\text{CO}_3$ (毫升)	$\text{NaHCO}_3$ (毫升)
9.16	8.77	1	9
9.40	9.12	2	8
9.51	9.40	3	7
9.78	9.50	4	6
9.90	9.72	5	5
10.14	9.90	6	4
10.28	10.08	7	3
10.53	10.28	8	2
10.83	10.57	9	1

$\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  分子量=286.2; 0.1摩尔/升溶液为 28.62 克/升。

$\text{NaHCO}_3$  分子量=84.0; 0.1摩尔/升溶液为 8.40 克/升。

## 五、常用酸碱指示剂

### (一) 某些常用指示剂:

名 称	配 制 方 法	pH 范 围
百里酚蓝(Thymol blue) (酸范围)	0.1 克溶于 10.75 毫升 0.02 摩尔/升 $\text{NaOH}$ , 用水稀释到 250 毫升	1.2—2.8 红 黄
溴酚蓝 (Bromophenol blue)	0.1 克溶于 7.45 毫升 0.02 摩尔/升 $\text{NaOH}$ , 用水稀释到 250 毫升	3.0—4.6 黄 蓝
甲基红(Methyl red)	0.1 克溶于 18.6 毫升 0.02 摩尔/升 $\text{NaOH}$ , 用水稀释到 250 毫升	4.4—6.2 红 黄
溴甲酚紫 (Bromocresol purple)	0.1 克溶于 9.25 毫升 0.02 摩尔/升 $\text{NaOH}$ , 用水稀释到 250 毫升	5.2—6.8 黄 紫
酚红(Phenol red)	0.1 克溶于 14.20 毫升 0.02 摩尔/升 $\text{NaOH}$ , 用水稀释到 250 毫升	6.8—8.0 黄 红
百里酚蓝(Thymol blue) (碱范围)	0.1 克溶于 10.75 毫升 0.02 摩尔/升 $\text{NaOH}$ , 用水稀释到 250 毫升	8.0—9.6 黄 蓝
酚酞(Phenolphthalein)	0.1 克溶于 250 毫升 70% 乙醇	8.2—10.0 无色红紫



## (二) 混合指示剂

指示剂溶液的组成	变色点 pH	酸性	碱性	备 注
1 份 0.1% 甲基黄乙醇溶液 1 份 0.1% 甲烯蓝乙醇溶液	3.28	蓝紫	绿	pH=3.4 绿色 pH=3.2 蓝紫
4 份 0.1% 甲基红乙醇溶液 1 份 0.1% 甲烯蓝乙醇溶液	5.4	红紫	绿	pH=5.2 红紫 5.4 暗蓝, 5.6 绿色
1 份 0.1% 中性红乙醇溶液 1 份 0.1% 甲烯蓝乙醇溶液	7.0	蓝紫	绿	pH=7.0 蓝紫 保存于深色瓶中
1 份 0.1% $\alpha$ -萘酚乙醇溶液 3 份 0.1% 酚酞乙醇溶液	8.9	浅红	紫	pH=8.6 浅绿 9.0 紫色

## 六、常用酸碱试剂的浓度及比重

试 剂	比 重	摩尔浓度	重量百分浓度(%)
醋酸	1.05	17.4	99.7
氨水	0.90	14.8	28.0
盐酸	1.19	11.9	36.5
硝酸	1.42	15.8	70.0
高氯酸	1.67	11.6	70.0
磷酸	1.69	14.6	85.0
硫酸	1.84	17.8	95.0

## 七、标准溶液的制备和标定

### (一) 0.1 当量/升氢氧化钠溶液的配制和标定

#### 1. 0.1 当量/升标准邻苯二甲酸氢钾溶液的配制

称取分析纯、于 100—125°C 干燥的邻苯二甲酸氢钾 ( $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ , 分子量 = 当量 = 204.2) 基准试剂约 10.2 克 (准确到

0.1 毫克)。用水溶解后按定量分析操作全部转移到 500 毫升容量瓶中并稀释到刻度。混匀，转移到干燥洁净的玻塞密闭的试剂瓶中。计算出溶液的准确当量浓度并贴好标签。

## 2. 0.1 当量/升氢氧化钠溶液的制备

### (1) 不含碳酸钠的浓氢氧化钠的制备

将 110 克分析纯氢氧化钠固体置于 300 毫升锥形瓶中，加 100 毫升水，不时振荡。溶解后用橡皮塞塞紧并静置数日直到碳酸钠全部沉于底部时，倾出上面清彻液备用。100 毫升此不含碳酸钠的浓溶液约含 NaOH 75 克。

(2) 0.1 当量/升标准氢氧化钠的制备 取以上氢氧化钠浓溶液 5.5 毫升，加水至一升。混匀，贮于具有橡皮塞的试剂瓶中。

(3) 标定：准确量取 20 毫升 0.1 当量/升邻苯二甲酸溶液 20 毫升，加酚酞指示剂 3—4 滴，用约 0.1 当量/升氢氧化钠溶液滴定至微红色，记下氢氧化钠的滴定体积。重复做三份。

### (4) 计算

$$N_{\text{NaOH}} = \frac{20 \times W \times 1000}{204.2 \times V} \text{ (当量/升)}$$

式中  $W = \text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$  的称量(克)。

$V =$  标准氢氧化钠溶液滴定体积(毫升)

$N_{\text{NaOH}} =$  标准氢氧化钠溶液准确当量浓度

## (二) 0.1 当量/升标准盐酸的配制和标定

吸取分析纯盐酸(约 12 当量/升)8.5 毫升加水至 1 升，混匀后用 0.1 当量/升标准氢氧化钠溶液滴定，用甲基红作为指示剂。

$$N_{\text{HCl}} = \frac{N_{\text{NaOH}} V_{\text{NaOH}}}{V_{\text{HCl}}}$$

$N_{\text{HCl}}$ 、 $N_{\text{NaOH}}$  分别为盐酸与氢氧化钠的准确当量浓度。

$V_{\text{HCl}}$ 、 $V_{\text{NaOH}}$  分别为盐酸与氢氧化钠溶液的毫升数。

### (三) 0.1当量/升标准硫代硫酸钠溶液的制备和标定

称 50 克硫代硫酸钠溶在煮沸后冷却的蒸馏水中, 加煮过的蒸馏水到 2,000 毫升。用标准 0.1 当量/升碘酸钾溶液 (0.3567 克  $\text{KIO}_3$  溶解后定容至 100 毫升) 标定, 标定时取 0.1 当量/升  $\text{KIO}_3$  溶液 20 毫升加  $\text{KI}$  1 克及 6 当量/升  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 毫升, 用所配制的  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  溶液滴定至浅黄色后, 加 10% 淀粉指示剂 3 滴, 使溶液呈蓝色, 继续滴定至蓝色消失。计算  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  溶液的滴定体积和准确浓度。



碘酸钾分子中的碘反应后, 从正 5 价降到负 1 价, 其化学价的变动为 6。碘酸钾的分子量为 214.01, 所以碘酸钾在此反应中的氧化还原当量为  $214.01/6 = 35.67$ 。

$$\begin{aligned} \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ 溶液当量浓度} &= \frac{N_{\text{KIO}_3} \cdot V_{\text{KIO}_3}}{V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}} \\ &= \frac{0.1 \times 20}{V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}} = \frac{2}{V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}} \end{aligned}$$

$V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$  为  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  溶液的滴定体积(毫升)。

## 八、元素的原子量表

元 素	符 号	原 子 量	元 素	符 号	原 子 量
银	Ag	107.868	钼	Mo	95.94
铝	Al	26.9815	氮	N	14.0067
砷	As	74.9216	钠	Na	22.9898
金	Au	196.967	铌	Nb	92.906
硼	B	10.811	镍	Ni	58.71
钡	Ba	137.34	氧	O	15.9994
铍	Be	9.0122	锇	Os	190.2
铋	Bi	208.980	磷	P	30.9738
溴	Br	79.909	钋	Pa	231.0
碳	C	12.01115	铅	Pb	207.19
钙	Ca	40.08	钯	Pd	106.4
镉	Cd	112.40	铂	Pt	195.09
铈	Ce	140.12	镭	Ra	226.0
氯	Cl	35.453	铷	Rb	85.47
钴	Co	58.9332	铈	Re	186.2
铬	Cr	51.996	铑	Rh	102.905
铯	Cs	132.905	钌	Ru	101.07
铜	Cu	63.54	硫	S	32.064
氟	F	18.9984	锑	Sb	121.75
铁	Fe	55.847	钪	Sc	44.956
镓	Ga	69.720	硒	Se	78.96
锗	Ge	72.59	硅	Si	28.086
氢	H	1.0079	锡	Sn	118.69
氦	He	4.0026	锶	Sr	87.62
铪	Hf	178.49	钽	Ta	180.948
汞	Hg	200.59	碲	Te	127.60
碘	I	126.9044	钍	Th	232.038
铟	In	114.82	钛	Ti	47.90
铱	Ir	192.2	铊	Tl	204.37
钾	K	39.102	铀	U	238.03
镧	La	138.91	钒	V	50.942
锂	Li	6.939	钨	W	183.85
镁	Mg	24.312	铀	Y	88.905
锰	Mn	54.9381	铕	Zn	65.37
			铈	Zr	91.22

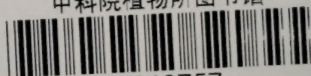


## 九、基础生物化学实验学生使用仪器清单(一组)<sup>①</sup>

仪 器	规 格	数 量	仪 器	规 格	数 量
试管	150×14mm	20支	漏斗	48—55mm	4个
	150×18mm	10支		75mm	1个
刻度试管	25ml	10支	乳钵	80mm	1套
离心试管	圆底, 10ml	4支	标本缸		1个
烧杯	500ml	1个	试管架		1个
	250ml	1个	吸管架		1个
	100ml	2个	吸耳球		1个
	50ml	2个	竹夹		2个
锥形瓶	150ml	4个	表面皿	90mm	1个
	50ml	4个		45mm	4个
吸管	10ml	4支	白色反应盘	6凹	1个
	5ml	4支	白磁板		1个
	2ml	4支	培养皿	90mm	1套
	1ml	8支		120mm	1套
	0.5ml	8支	药勺		2个
	0.2ml	4支	称瓶		1个
	0.1ml	4支	温度计	酒精0—100°C	1支
容量瓶	100ml	2个	滴管	中	2支
	50ml	4个		小	2支
量筒	100ml	2个	玻棒	大、中、小	各2支
	50ml	2个	药用天平		两组1套
	10ml	1个	白磁盘		两组1个
量杯	5ml	1个	电炉		三组1个
磁杯	500ml	1个			

① 个别实验临时补发的仪器未列入上表。

中科院植物所图书馆



S0013757

收到期	83年8月2日
来源	32.92元 (21元)
书价	0.75元
单据号	58.17 163
开票日期	8

012550

基础生物化学实验

借者单位	借者姓名	借出日期	还书日期
------	------	------	------

书	王	83.9.22	
---	---	---------	--

书	王	87.9.22	
---	---	---------	--

012550





封面设计：符昂扬

书号 13012·0804  
定价 0.75 元